

Aus dem  
Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg  
Arbeitsgruppe Molekulare Neurowissenschaften  
Leiter: Prof. Dr. med. E. Weihe

**Einfluss der SIV-Infektion und einer antiretroviralen  
Therapie auf die Expression von vesikulären  
Transmitterproteinen im Striatum von Rhesus Affen**



Inaugural - Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Nedye Naumann**

aus Gronau, Westf.

**Marburg, 2015**

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am  
14.12.2015.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer

Referenten: Prof. Dr. med. E. Weihe, PD Dr. med. C. Depboylu

1. Korreferent: Prof. Dr. Czubayko

***für Frank***

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>III ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>10</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Das humane Immundefizienz-Virus (HIV) .....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Aufbau und Replikationszyklus des HIV.....	14
1.1.2 Die antiretrovirale Therapie .....	15
1.1.3 Neuro-AIDS .....	17
1.1.4 Das simiane Immundefizienz-Virus (SIV) .....	19
1.1.5 Die SIV-Infektion von Rhesus Affen .....	19
<b>1.2 Funktionelle Anatomie der Basalganglien .....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Das Striatum .....	22
1.2.2 Nervenzellen des Striatums.....	22
1.2.3 Neurochemie des Striatums .....	23
1.2.3.1 Das dopaminerge (DAerge) System im Striatum .....	24
1.2.3.2 Striatale TH+ Neurone.....	25
1.2.3.3 Das glutamaterge System im Striatum.....	26
1.2.3.4 Das GABAerge System im Striatum .....	27
1.2.3.5 Das cholinerge System im Striatum .....	27
1.2.3.6 Auswirkungen einer HIV-Infektion auf das DOPAerge/DAerge und cholinerge System im Striatum .....	28
<b>1.3 Vesikuläre Speicherung von Neurotransmittern.....</b>	<b>30</b>
1.3.1 Ausgewählte vesikuläre Transporterproteine .....	31
1.3.2 Der vesikuläre Monoamin-Transporter 2 (VMAT-2).....	31
1.3.3 Der vesikuläre ACh-Transporter (VACHT) .....	33
1.3.4 Der vesikuläre Glutamat-Transporter 1 (VGLUT-1) .....	34
1.3.5 Der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT) .....	35
<b>2 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>37</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.2.1 Charakterisierung der Versuchstiere und Gruppierungen .....	41
<b>3.3 Gewinnung des Probenmaterials.....</b>	<b>42</b>

3.3.1	Präparation und Fixierung, ZNS Gewebegewinnung .....	42
3.3.2	Vorbereitung der Objektträger .....	43
3.3.3	Schnitte von in Paraffin eingebetteten Geweben .....	44
3.3.4	Übersichtsfärbungen mit Giemsa .....	44
<b>3.4</b>	<b>Immunhistochemische Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Antikörper und Detektionssysteme .....	45
3.4.2	Einfache enzymatische Immunhistochemie (IHC) .....	47
3.4.3	Immunhistochemische Doppelfluoreszenzmarkierung .....	49
3.4.4	Coronare Schnittebenen .....	51
<b>3.5</b>	<b>Auswertungen und statistische Analysen .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	Bestimmung der optischen Dichte der TH+, ChAT+, VAcHt+, VGLUT-1+, VGAT+ und VMAT-2+ Nervenzellen .....	52
3.5.2	Quantifizierungen der TH+, ChAT+ und VAcHt+ Neurone .....	53
3.5.3	Darstellung der Immunreaktivität der Neuroinflammation .....	54
3.5.3.1	Auswertung der Iba-1+ mikroglialen Entzündungsreaktion .....	54
3.5.3.2	Auswertung der GFAP+ astroglialen Entzündungsreaktionen .....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Darstellung der lentiviralen Entzündungsreaktion .....</b>	<b>56</b>
4.1.1	Der Einfluss einer lentiviralen Infektion und deren antiretrovirale Behandlung auf die striatale Viruslast .....	56
4.1.2	Iba-1 als Marker für immunaktive Zellen .....	57
4.1.3	GFAP als Marker für Astrozyten und Astroglie .....	58
<b>4.2</b>	<b>Effekte einer lentiviralen Infektion und der antiretroviralen Behandlung auf das monoaminerge System im Striatum .....</b>	<b>59</b>
4.2.1	Irreversible VMAT-2-Reduktion bei teilweiser Erholung der TH-Faserdichte .....	59
4.2.2	Phänotypisierung der TH+ Neurone .....	62
<b>4.3</b>	<b>Effekte von lentiviraler Infektion und antiretroviraler Therapie auf das cholinerge System im Striatum .....</b>	<b>63</b>
4.3.1	Abnahme der VAcHt+ Faserdichte bei unveränderter ChAT+ Faserdichte .....	63
4.3.2	Abnahme VAcHt+ und ChAT+ Neurone ohne Effekt der antiretroviralen Behandlung .....	65
<b>4.4</b>	<b>GABAerge und glutamaterge Faserdichte bleiben von lentiviraler Infektion unbeeinflusst .....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Reversibilität der SIV-induzierten mikroglialen Entzündungsreaktion durch die antiretrovirale Therapie .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Reversibilität der SIV-induzierten Astrozytose durch die antiretrovirale Behandlung .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3</b>	<b>Deutliche Restitution des TH+ Faserverlustes durch die antiretrovirale Therapie .....</b>	<b>70</b>
5.3.1	Unveränderte Zahl von TH+ Neuronen im Striatum .....	72

5.4	Bedeutung der irreversiblen Reduktion der VMAT-2+ Faserdichte .....	73
5.5	SIV-induzierte Reduktion der ChAT+ und VAcHt+ Neuronenzahl bei unveränderter ChAT+ Faserdichte im Striatum .....	76
5.6	Bedeutung der nur teilweise reversiblen VAcHt+ Faserdichte .....	78
5.7	Keine Beeinträchtigung vesikulärer Speicherproteine für GABA und Glutamat während der SIV-Infektion .....	79
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	81
7	ANHANG .....	97
7.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	97
7.2	Danksagung.....	98

## I. Zusammenfassung

Seit dem Ausbruch der AIDS-Pandemie sind komplexe kognitive und sensomotorische neurologische Komplikationen im Zuge einer HIV-Infektion bekannt. Sie werden als HAND (HIV-associated neurocognitive diseases) zusammengefasst und stellen trotz antiretroviraler Therapien nach wie vor ein relevantes gesundheitliches und sozioökonomisches Problem dar. Prävention und Therapie von HAND sind nicht zufriedenstellend gelöst. Neuroinflammation im ZNS wird als wichtiger pathogenetischer Faktor in der Entwicklung von HAND angesehen. Regionen-spezifische Veränderungen in cerebralen Transmittersystemen sind ein weiterer Faktor HAND-assoziiierter neurologischer Dysfunktionen. Das Striatum gilt als besonders vulnerable Region.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die klassischen Transmittersysteme im Striatum im Zuge einer SIV-Infektion des Rhesus-Makaken und deren antiretroviraler Therapie transient oder permanent verändern. Insbesondere sollte geklärt werden, inwieweit die vesikulären Transportproteine der klassischen Transmittersysteme im Striatum von der SIV-Infektion betroffen sind und ob, wie in anderen ZNS-Regionen beobachtet, dissoziierte oder konkordante Veränderungen entsprechender transmittersynthetisierender Enzyme auftreten. Des Weiteren sollte geklärt werden, wie sich die Veränderungen striataler Transmitterenzyme und vesikulärer Transporterproteine zur neuroinflammatorischen Signatur mikroglialer und astrozytärer Reaktionen im Zuge der SIV-Infektion und deren antiretroviralen Therapie verhalten.

Zur Klärung dieser Fragen wurden immunhistochemische Analysen von striatalem Gewebe aus vier Versuchsgruppen des SIV-Modells durchgeführt: 1. Nicht-infizierte Kontrollgruppe, 2. SIV-infizierte, nicht an AIDS erkrankte Gruppe von Rhesus Makaken (SIV/-AIDS), 3. SIV-infiziert, an AIDS erkrankt (SIV/+AIDS), 4. SIV-infiziert, an AIDS erkrankt und anschließend antiretroviral behandelt (SIV/+AIDS/+ddG). Das entsprechende striatale Gewebe stand im Rahmen des durch die Volkswagen-Stiftung geförderten Kooperationsprojektes "Mechanism of neuronal dysfunction in a primate model for CNS viral and immune disease" der AG Weihe und der AG Eiden (NIMH, NIH, Bethesda, MD) zur Verfügung.

Eine striatale Viruslast (SIV *gp41*+) wurde ausschließlich in der SIV/+AIDS Gruppe nachgewiesen. Die neuroinflammatorische Signatur der SIV-Infektion wurde durch Quantifizierung der gegenüber der Kontrollgruppe beobachteten parallelen Zunahme Iba-1 (Iba-1+) positiver Mikrogliazellen sowie Iba-1+ Monozyten/multinukleärer

Riesenzellen einerseits und GFAP-positiver Astrozyten andererseits erfasst. In der SIV/-AIDS Gruppe zeigte sich eine mäßige mikrogliale und astrozytäre neuroinflammatorische Signatur. In der SIV/+AIDS Gruppe war eine maximale neuroinflammatorische Signatur zu verzeichnen. Unter antiretroviraler Therapie war das Niveau der neuroinflammatorischen Signatur auf dem Niveau der SIV/-AIDS Gruppe. Der vesikuläre Monoaminotransporter-2 (VMAT-2), der im Striatum im Wesentlichen die nigrostriatale dopaminerge (DAerge) Innervation repräsentiert, war in der SIV/+AIDS Gruppe deutlich reduziert. Die SIV-induzierte Reduktion der striatalen VMAT-2+ Faserdichte wurde durch die antiretrovirale Therapie nicht auf Kontrollniveau normalisiert. Im Gegensatz zur Persistenz der reduzierten striatalen VMAT-2+ Faserdichte wurde die SIV-induzierte Reduktion der striatalen Tyrosinhydroxylase-positiven (TH+) Faserdichte durch die antiretrovirale Behandlung fast auf Kontrollniveau normalisiert. Dagegen blieb die Anzahl intrinsischer striataler TH+ Neurone von einer SIV-Infektion und antiretroviraler Therapie unbeeinflusst. Der vesikuläre Acetylcholin-Transporter (VACHT), der ein Marker für die cholinerge Innervation im Striatum ist, war in der SIV/+AIDS Gruppe um ca. 40% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Die antiretrovirale Behandlung führte nur zu einer geringen Restitution der VACHT+ Faserdichte. Dagegen zeigte sich die Cholinacetyltransferase-positive (ChAT+) Faserdichte im Striatum während der SIV-Infektion und ihrer antiretroviralen Therapie nicht verändert. Im Gegensatz zu der unveränderten ChAT+ Faserdichte ergab die Analyse der ChAT+ Neuronenzahl eine bemerkenswerte numerische Reduktion in der SIV/-AIDS Gruppe. In der SIV/+AIDS Gruppe war die ChAT+ Neuronenzahl noch stärker reduziert. Diese Reduktion zeigte sich gegenüber der antiretroviralen Behandlung resilient. Im Gegensatz zu den charakteristischen transienten und permanenten inflammationsabhängigen oder -unabhängigen Veränderungen für cholinerge und monoaminerge Transmittertransporter und deren synthetisierenden Enzyme im Striatum waren der vesikuläre GABA Transporter (VGAT) für die GABAerge und der vesikuläre Glutamat-Transporter-1 (VGLUT-1) für die glutamaterge Neurotransmission während der SIV-Infektion und ihrer antiretroviralen Therapie nicht verändert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Striatum während einer lentiviralen Infektion/AIDS-Erkrankung von selektiven Veränderungen der cholinergen und monoaminergen Transmittersysteme betroffen ist, die sich als therapieresistent erwiesen oder durch die antiretrovirale Behandlung nur partiell normalisiert wurden. Daraus ist zu schließen, frühzeitig im Verlauf der HIV-Infektion mit BHS-gängigen antiretroviralen Medikamenten zu intervenieren, um nachhaltige Schädigungen von cholinergen und monoaminergen Transmittersystemen zu präventieren.



## II. Abstract

Since the outbreak of the AIDS pandemic complex cognitive and sensorimotor complications in the course of a HIV-infection have been observed. They are summarized as HAND (HIV-associated neurocognitive diseases) and still pose, in spite of antiretroviral therapy, a relevant public health and socioeconomic problem. Prevention and treatment of HAND are not solved yet satisfactorily. Neuroinflammation in the CNS is considered to be an important pathogenetic factor in the development of HAND. Among others, regions-specific changes in cerebral transmitter systems provide another factor of HAND-associated neurological dysfunction. The striatum has been shown to be particularly vulnerable during a HIV-infection.

The aim of the present thesis was to examine transient and permanent changes of classical neurotransmitter systems in the striatum in the course of SIV-infection of rhesus macaques and their antiretroviral therapy. In particular, it should be clarified to what extent the vesicular transporters of classical transmitter systems in the striatum are affected by the SIV-infection, and whether, as observed in other CNS regions, dissociated or concordant changes of corresponding transmitter-synthesizing enzymes occur. Furthermore, we investigated how changes of striatal transmitter enzymes and vesicular transporters relate to the neuroinflammatory signature of microglial and astrocytic reactions in the course of SIV-infection and their antiretroviral therapy.

In order to answer these questions immunocytochemical analysis were performed on striatal tissues of four experimental groups in the SIV model of rhesus macaques: 1. Uninfected control group, 2. SIV-infected, without AIDS group (SIV/-AIDS), 3. SIV-infected, suffering from AIDS (SIV/+AIDS), 4. SIV-infected, suffering from AIDS and subsequently antiretroviral treatment (SIV/+AIDS/+ddG). The used striatal tissue samples are taken from the research collaboration "Mechanism of neuronal dysfunction in a primate model for CNS viral and immune disease" (supported by the Volkswagen foundation) of Weihe and Eiden (NIMH, NIH, Bethesda, MD).

A striatal virus load (SIV/ *gp41*+) was detected exclusively in the SIV/+AIDS group. Compared to the control group the neuroinflammatory signature of the SIV-infection was captured by quantification of the observed parallel increase of Iba-1 positive monocytes/ multinucleated giant cells on the one hand and GFAP positive astrocytes on the other hand. A moderate microglial and astrocytic neuroinflammatory signature was already seen in the SIV/-AIDS group. The SIV/+AIDS group had a maximum

neuroinflammatory signature. The level of the neuroinflammatory signature was in the course of antiretroviral treatment as high as the level seen in the SIV/-AIDS group.

The vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2), which essentially represents the nigrostriatal DAergic innervation, was significantly reduced in the SIV/+AIDS group. The SIV-induced reduction of striatal VMAT2 fiber density was not normalized to the level of control by antiretroviral therapy. In contrast to the persistence of reduced striatal VMAT2+ fiber density, the SIV-induced reduction of the TH+ fiber density was normalized almost to the control level by the antiretroviral treatment. By contrast, the number of intrinsic striatal TH+ neurons remained unaffected by SIV-infection and antiretroviral treatment.

Compared to the control group the vesicular acetylcholine transporter (VACht), which is a marker for the cholinergic innervation in the striatum, was reduced to approximately 40% in the SIV/+AIDS group. The antiretroviral treatment resulted in a only small restitution of VACht+ fiber density. By contrast, the cholinergic acetylcholine transferase (ChAT) fiber density in the striatum showed no changes during SIV-infection and its antiretroviral therapy.

In contrast to the unchanged ChAT+ fiber density there was a remarkable numerous reduction of ChAT+ neurons in the SIV/-AIDS group. The ChAT+ neuronal number was even more reduced in the SIV/+AIDS group.

Unlike the characteristic transient and permanent inflammationdependent or -independent changes of cholinergic and monoaminergic vesicular transporters and their synthesizing enzymes in the striatum, there were no changes observed in the vesicular GABA transporter (VGAT) for the GABAergic and vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) for the glutamatergic neurotransmission during SIV-infection and its antiretroviral treatment.

The results of this work show that selective changes of cholinergic and monoaminergic transmitter systems occur in the striatum during a lentiviral infection/AIDS disease, which are not affected by antiretroviral treatment, or at least are partially normalized by antiretroviral therapy.

The conclusion is to intervene early in the course of HIV-infection with brain-blood-barrier current antiretroviral drugs in order to prevent sustained damage to cholinergic and monoaminergic transmitter systems.

### III Abkürzungsverzeichnis

6-Cl-ddG	6-Chloro-2',3'-Dideoxyguanosin
AADC	aromatische Aminosäure-Decarboxylase
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ACh	Acetylcholin
AChE	ACh-Esterase
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ANI	asymptomatische neurokognitive Beeinträchtigung
ANOVA	Analyse der Varianz
ARC	AIDS-bezogene Krankheitszustände
ART	antiretrovirale Therapie
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BIV	bovines Immunodefizienz-Virus
BSA	bovines Serumalbumin
cART	kombinierte antiretrovirale Therapie
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CD	Cluster der Differenzierung
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
COMT	Katechol-O-Methyl-Transferase
COX	Cyclooxygenase
DA	Dopamin
DAT	DA-Transporter
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DHTBZ	Dihydrotetrabenazin
DNA	Desoxyribonuklein-Säure
DS	dorsales Striatum
EAATs	exzitatorische Aminosäure-Transporter

ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
GABA	Gamma-Aminobutyryl-Säure
GFAP	gliales fibrilläres Säureprotein
Glu	Glutamat
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
gp120	Glykoprotein 120
gp41	Glykoprotein 41
HAD	HIV-assoziierte Demenz
HAND	HIV-assoziierte neurokognitive Dysfunktion
HIV	humanes Immunodefizienz-Virus
HIVE	HIV-Enzephalitis
Iba-1	ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül-1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INF	Interferon
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
LDCV	grosse, elektronendichte Vesikel
Lsg.	Lösung
MND	moderate/milde neurokognitive Störung
MAO	Monoaminoxidase
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6 Tetrahydropyridin
MSN	mittelgrosse, dornentragende Neurone
NC	Nucleus caudatus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NNTRI	nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren
NRTI	nukleosidische RT-Inhibitoren
OTs	Objektträger
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Put	Putamen
PI	Protease-Inhibitoren
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkriptase
SDF-1	Gewebszellmediator Faktor-1
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
SIV	simianes Immunodefizienz-Virus
SIVE	SIV-Enzephalitis
SLC	Transportprotein für gelöste Stoffe
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticularis
STN	Nucleus subthalamicus
STR	Striatum
SSV	kleine synaptische Vesikel
SV	synaptischer Vesikel
TBZ	Tetrabenazin
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumornekrosefaktor
TEXANs	toxische Substanzen auss tossende Antiporter-Systeme
VACHT	vesikulärer ACh-Transporter
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VGLUT-1	vesikulärer Glutamat-Transporter 1
VMAT-2	vesikulärer Monoamin-Transporter 2
VS	ventrales Striatum
WHO	Weltgesundheitsbehörde
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Das humane Immundefizienz-Virus (HIV)

Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) ist das HIV. Der erstmaligen Beschreibung der erworbenen, bis heute schwerwiegendsten, Immunschwächekrankheit AIDS als klinische Entität im Jahr 1981 (Gottlieb et al. 1981; Masur et al., 1981) folgte die Virusisolation aus Lymphozyten an AIDS erkrankter Patienten im Jahr 1983 (Barre Sinoussi et al., 1983). Seit dem Auftritt der ersten Fälle hat die Ausbreitung des HIV pandemische Ausmaße angenommen, die bisher zu mehr als 25 Mio. Todesfälle durch AIDS geführt hat. Die UNAIDS-Organisation schätzt die Zahl der Menschen weltweit, die Ende 2012 mit HIV/AIDS lebten, auf 35,3 Millionen (UNAIDS, 2013). In Deutschland betrug der Anteil HIV-Infizierter Ende 2012 ca. 78000, wobei die Zahl der Neuinfektionen mit ca. 820 rückläufig war (RKI, 2013). Das HIV infiziert in erster Linie CD4-positive (CD4+) Zellen (insb. T-Helfer-Lymphozyten), die eine zentrale Rolle bei der Immunantwort auf Infektionen spielen. Bei einem gesunden Menschen beträgt die Menge an T-Helfer-Zellen 800-1200 / $\mu$ l Blut. Sinkt die Menge unter 200 T-Helfer-Zellen/ $\mu$ l werden Erkrankte anfälliger für Infektionen und entwickeln im Vollbild die Immunschwächekrankheit AIDS.

Aus dem Jahr 1959 stammt die älteste gesicherte Infektion. Aus einer seropositiven Plasmaprobe aus Afrika konnte die Virussequenz amplifiziert und charakterisiert werden (Zhu et al., 1998). Der Ursprung der HI-Viren wird in unterschiedlichen Immunschwächeviren von Chimpansen aus West- und Zentralafrika vermutet, wobei eine direkte und eine über Gorillas führende indirekte Übertragung auf Menschen angenommen wird (Hahn et al., 2010). Es werden zwei Typen von HIV unterschieden: HIV-1 und HIV-2. Während HIV-2 in Westafrika lokal verbreitet ist, dominiert HIV-1 weltweit. HIV-2 wird eine geringere Viruspathogenität zugeschrieben, da es sich weniger effizient repliziert. Während der pandemischen HIV-Ausbreitung erfolgte eine genetische Diversität. So wird HIV-1 weiter in 4 Gruppen (M, N, O und P), in Subgruppen und in zirkulierende rekombinante Formen untergliedert. Der HIV Subtyp-B hat sich in den letzten Jahren zum dominierenden Virusstamm weltweit entwickelt (Lau und Wong, 2013). Die unvorhersehbare und dynamische Ausbreitung der genetischen Stämme und die Entwicklung von neuen rekombinanten Virusvarianten beeinflussen erheblich die diagnostische Sicherheit, antiretrovirale Therapie und den Krankheitsverlauf.

HIV gehört zu der Familie der Lentiviren, welche eine Gattung innerhalb der Retroviren bilden. Lentiviren sind komplexe, behüllte Einzel(+)-Strang RNA-Viren, deren viruseigene Integrase die durch die reverse Transkriptase (RT) gebildeten DNA-Doppelstränge in das Genom der Wirtszelle integriert. Im Gegensatz zu einfachen

Retroviren haben Lentiviren zusätzliche regulatorische Enzyme, die für eine erhöhte Virusreplikation zuständig sind. Desweiteren zeichnen sich Lentiviren durch lange Inkubationszeiten (Monate bis Jahre) aus (lentus = langsam), die zur Entwicklung chronischer Krankheiten führen.

Zu den Primaten-Lentiviren werden HIV-1, und HIV-2 sowie das simiane Immundefizienz-Virus (SIV) gezählt. Die experimentelle SIV-Infektion von Rhesus Affen ist ein etabliertes Modell für die Erforschung der HIV-Neuropathogenese (Eiden et al., 1999).

### 1.1.1 Aufbau und Replikationszyklus des HIV

Das HIV infiziert CD4+ Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritische Zellen. HIV-Virionen haben einen Durchmesser von ca. 100 nm, bestehen aus einem inneren Kapsid und einer Hüllmembran (Palmer und Goldsmith, 1988). Das Kapsid ist aus 2000 p24-Proteinen aufgebaut und umschließt zwei einzelsträngige RNA, die die Kopien der neun Virusgene enthalten. Dazu gehören die drei Strukturgene gag (für Kernproteine), pol (für die Enzyme Integrase, RT und Protease) und env (für Hüll- und Membranproteine) (Trono, 1995). Für eine erfolgreiche Replikation und Infektion des HIV sind die drei regulatorischen Gene tat, rev und nef und die drei Hilfsgene vif, vpr und vpu notwendig. Die Kapsidproteine bilden die Enzyme RT, Integrase und Protease (Weiss, 1996; Ganser-Pornillos et al., 2008). In der HIV-Hülle ist das komplexe env-Protein eingebettet, das aus einem transmembranen Anteil (gp41) und einem Oberflächenprotein (gp120) besteht. Beide vermitteln das Eindringen des HIV in die Wirtszelle. Hierbei bindet das Glykoprotein gp120 an den CD4-Rezeptor (Sattenau et al., 1988) und an membranständige Chemokinkorezeptoren, die die Präferenz von Virusvarianten für bestimmte Zelltypen zeigen (Broder und Collman, 1997). Der Chemokinrezeptor CCR5 (Kofaktor für makrophagotrope Virusvarianten) wird auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert, während CXCR4 (Kofaktor für lymphotrope Virusvarianten) auf aktivierten T-Zellen vorzufinden ist. Das mit gp120 nicht-kovalent verbundene transmembrane Glykoprotein gp41 induziert daraufhin die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle (Freed et al., 1990). Genetische Varianten von Chemokinrezeptoren werden mit einer HIV-Resistenz in Verbindung gebracht. So wird ein nicht-funktioneller CCR5-Rezeptor (heterozygoter CCR5- $\Delta$ 32 oder homozygoter CCR5- $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 Genotyp) mit einer verlangsamten Progression oder gar Resistenz der HIV-Infektion assoziiert (Vassart et al. 1996; Seage et al., 2001; Patino et al., 2002; uvm.). Dementsprechend sind Chemokinrezeptoren

noch immer Gegenstand von Forschungsansätzen, die einen neuen Behandlungsansatz für die Prävention oder Behandlung einer HIV-Infektion untersuchen.

Nach Fusionierung der Virushülle mit der Zellmembran werden die Virus-RNA und -Proteine in die Zelle freigesetzt. Es entsteht ein für Nukleotide durchlässiger RT-Komplex (Hsu und Wainberg, 2000), der die virale Einzelstrang-RNA in Doppelstrang-DNA umschreibt (Hughes und Whitcomb, 1992). Nach dem Transport der transkribierten DNA in den Zellkern wird diese mit Hilfe der HIV-Integrase in das Genom der Wirtszelle integriert (Provirus) und bei deren Zellteilung mitvererbt. Dies ermöglicht die Expression viraler Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase-II. Das virale Protein rev vermittelt den Export der nicht oder einfach gespleißten HIV-RNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Green und Peterlin, 2002; Wu, 2004), die dann durch die zelluläre Maschinerie zu regulatorischen und akzessorischen Proteinen translatiert werden. An der Zellmembran interagieren die verschiedenen Viruskomponenten unter Bildung neuer Viruspartikel miteinander, die dann als unreife Viruspartikel durch Knospung an der Zelloberfläche freigesetzt werden. Durch die Spaltung der gag und gag/pol Vorläuferproteine durch die virale Protease erfolgt die Reifung zu infektiösen Viren (Modrow et al., 1994; Freed, 1998; Sierra et al., 2005).

Der Verlauf einer HIV-Infektion wird in drei Phasen unterteilt. Die Primärinfektion verläuft meistens klinisch inapparent. Grippeähnliche Symptome sorgen dafür, dass eine akute HIV-Infektion meist unerkannt bleibt. Innerhalb der ersten Tage nach der Infektion kommt es allerdings schon zu einer starken Virusvermehrung in aktivierten Lymphozyten in Lymphknoten (Schacker et al., 2001). Auch in der folgenden, oft mehrjährigen Latenzperiode treten meistens keine gravierenden Symptome auf. In dieser Phase nimmt die Schwächung des Immunsystems zugunsten des Virus zu. Diese fortschreitende Schwächung begünstigt das Auftreten von klinischen Symptomen, die aber nicht zu den AIDS-definierenden Krankheiten gehören. Dies deutet auf die dritte Phase der HIV-Infektion, den ARC (AIDS-Related Complex) hin. Auf die weitere Schwächung des Immunsystems folgt die Diagnose AIDS, die schwere opportunistische Infektionen und bösartige Tumoren mit sich bringt.

### **1.1.2 Die antiretrovirale Therapie**

Ziel der antiretroviralen Therapie (ART) ist es, den HIV Replikationszyklus zu hemmen, um eine Unterdrückung der Krankheitsprogression und eine Restitution der zellulären Immunität zu erreichen. Angriffspunkte hierfür bieten beispielsweise die reverse Transkription und Integration, der HIV-Eintritt sowie die Prozessierung von Vorläuferproteinen durch die Protease. Die 1996 eingeführte Kombinations-Therapie



(cART: Combined Antiretroviral Therapy) besteht meist aus zwei nukleosidischen RT-Inhibitoren (NRTI), die mit einem nicht-nukleosidischen RT-Inhibitor (NNRTI) oder Protease-Inhibitor (PI) kombiniert werden. Die Einführung der cART bedeutet für HIV-Infizierte eine Verlängerung der Lebenszeit durch eine Reduzierung der viralen Last. Die in den letzten Jahren eingeführten Kombinationstherapien zeichnen sich durch einfachere Dosierungsvorgaben, weniger toxischen Effekten und vor allem durch eine geringere Anfälligkeit für die Entwicklung von Resistenzen aus (Weinberg 2008). Der Einsatz von RNA-Liganden als antiretrovirale Moleküle und die autologe Transplantation von genetisch veränderten hämatopoetischen Stammzellen bilden gute Zukunftsperspektiven für neuere Therapie-Strategien (Burnett, 2009; Dassie et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde aus der NRTI-Gruppe der lipophile und äußerst effektive Wirkstoff 6-Chloro-2',3'-Dideoxyguanosin (6-Cl-ddG) verwendet. Seine Entwicklung erfolgte im Rahmen von Forschungsarbeiten, um die Einflüsse einer antiretroviralen Therapie auf Neuro-AIDS zu untersuchen. Zahlreiche Experimente mit SIV-infizierten Rhesus Makaken konnten die gute ZNS-Wirksamkeit von 6-Cl-ddG durch eine verringerte cerebrale Viruslast und eine Reduktion der immun- und gliopathologischen Veränderungen belegen (Otani et al., 1997; Fuji et al., 1998; Depboylu et al., 2004).

Obwohl in der antiretroviralen Therapie rasante Fortschritte erzielt wurden, ist die Art der Therapie, auch unter dem Aspekt, eine neuroprotektive Wirkung zu erzielen, und der Zeitpunkt des Therapiebeginns noch immer Gegenstand unzähliger Diskussionen. Es wird angenommen, dass die Art der antiretroviralen Medikation unter dem Aspekt der Bluthirnschranke (BHS)-Gängigkeit einen Einfluss auf die Entstehung der HAND haben. Die gängige HAART scheint in der Kontrolle der cerebralen HIV-Infektion zu scheitern (Heaton et al., 2011). Befürworter einer frühen BHS-gängigen antiretroviralen Therapie sehen in ihr eine präventive Maßnahme gegen die Entstehung der HAND (Zink et al., 2010; Sanmarti et al., 2014). Es wurde gezeigt, dass eine bessere Suppression der ZNS-Viruslast mit einer verbesserten neurokognitiven Funktion einhergeht (Letendre et al., 2004; Patel et al., 2009). Letendre et al. erschufen 2008 ein Ranking-System für die Effektivität von BHS-gängigen antiretroviralen Medikamenten. Es basiert auf ihren chemischen Eigenschaften, der Liquorkonzentration und ihrer antiretroviralen Effektivität. Weitere Arbeiten fanden heraus, dass die Kombination mit Medikamenten, die eine höhere BHS-Gängigkeit aufweisen, zu einer verbesserten neurokognitiven Funktion beitragen könnte (Cusini et al., 2013). Dennoch gibt es bisher keine eindeutigen Studien, die die Effektivität der HAART bezüglich der Verbesserung neurokognitiver Dysfunktionen aufweisen. Auch konnte bisher nicht dargestellt werden, welche cART-

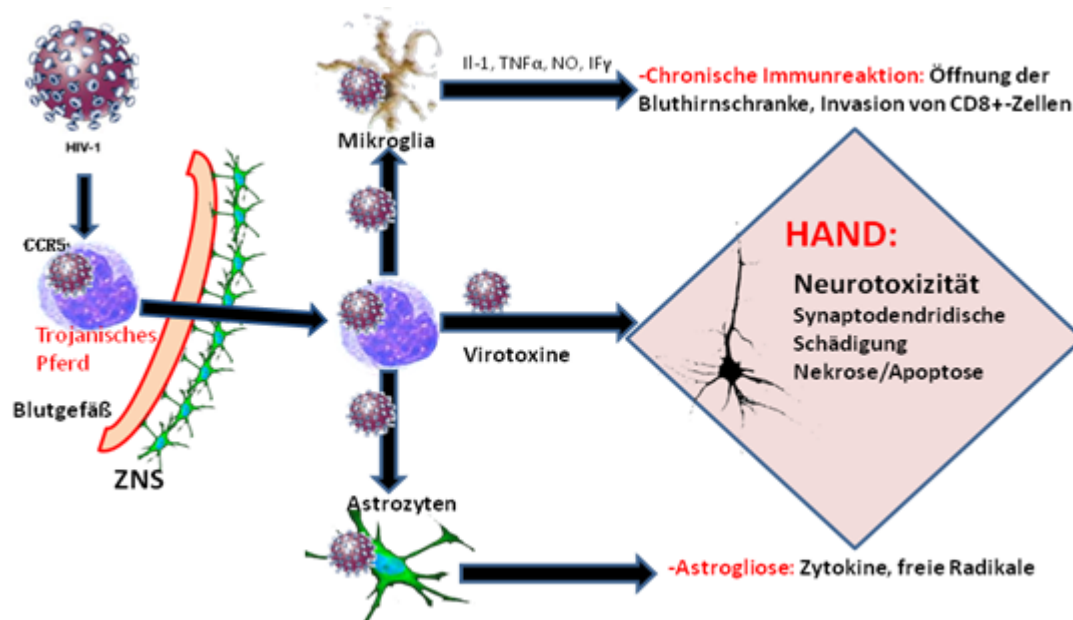
Zusammenstellung am besten für die Prävention oder Verbesserung von HAND geeignet ist.

### 1.1.3 Neuro-AIDS

Mit der Einführung der cART im Jahre 1996 ist die HIV-Infektion zu einer behandelbaren Erkrankung geworden, die jedoch noch immer nicht heilbar ist. Heute wird für neurologische Manifestationen einer HIV-Infektion der Begriff HIV-assoziierte neurokognitive Störung (HAND: HIV-Associated Neurocognitive Disorder) verwendet. Dieser umfasst die für dieses Krankheitsbild geprägten Begriffe wie HIV-assoziierte Demenz, HIV-Enzephalopathie und HIV-assoziiierter motorisch-kognitiver Komplex. Die Symptomausprägung wird in drei Schweregrade klassifiziert: asymptomatische neurokognitive Beeinträchtigung (ANI: Asymptomatic Neurocognitive Impairment), milde neurokognitive Störung (MND: Mild Neurocognitive Disorder) und HIV-assoziierte Demenz (HAD: HIV-Associated Dementia).

Unter der cART zeigt sich die Inzidenz von HAND nicht so rückläufig wie die der anderen AIDS-definierenden Krankheiten (Dore et al., 1999). Zwar werden bei antiretroviral behandelten Patienten nicht mehr die schweren Ausprägungen von HAND beobachtet, dafür werden aber leichte neurokognitive Störungen in bereits frühen Erkrankungsstadien nachgewiesen. Cerebrale Manifestationen der HIV-Infektion mit kognitiven und motorischen Störungen steigen mit der Lebenserwartung naturgemäß an. Aus diesem Grunde ist Neuro-AIDS noch immer ein Alltagsproblem der HIV-Medizin. Diese Beobachtungen rücken die Erforschung von neuroprotektiven Therapiestrategien in den Fokus von gegenwärtigen Forschungsansätzen. Hierbei werden eine mögliche irreversible Hirnschädigung vor einer Therapieinitiierung, eine insuffiziente Suppression der viralen Last im ZNS durch nicht ZNS-gängige Pharmaka und auch die neurotoxischen Effekte der Therapie selbst diskutiert. Laut der WHO entwickeln ca. ein Drittel der HIV-infizierten Erwachsenen eine demenzielle Erkrankung, die mit einer schlechten Prognose einhergeht. Ursächlich wird die rasch progrediente HAD zum einen direkt auf die HIV-Infektion, die sich in Form einer subkortikalen Demenz äußert (Berger und Arendt, 2000), und zum anderen auf Folgen der opportunistischen Infektionen und Neoplasien des Gehirns zurückgeführt. Frühe Symptome bilden neben Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörungen auch Beeinträchtigungen der Feinmotorik und Symptomen, die einem Parkinson-Syndrom ähneln. Zusätzlich werden demyelinisierende Neuropathien, Meningoenzephalitiden und auch neuropsychiatrische Störungen beobachtet.

Bereits in der frühen Infektionsphase dringt das HIV in das ZNS ein und befindet sich hier vornehmlich in Makrophagen und Mikroglia (Abb. 1). Diese setzen Chemokine, Zytokine und Virusproteine frei, die weitere nicht-infizierte Makrophagen und Mikroglia aktivieren (Kaul et al. 2000, Williams und Hickley, 2002). Diese Prozesse fördern die Ausschüttung von neurotoxischen Substanzen (Arachidonsäure, Sauerstoffradikale,  $\text{TNF}\alpha$ , Glutamat und Stickoxide), die sowohl zu einer direkten neuronalen Schädigung, als auch zu einer Verstärkung der inflammatorischen Prozesse führen. Zeitgleich kommt es im Rahmen dieser Prozesse zu einer Aktivierung von Astrozyten, die die Permeabilität der BHS weiter erhöhen. Der Interaktion zwischen Astrozyten und Makrophagen/Mikroglia wird eine zentrale Rolle in der Neuropathogenese der HIV-Enzephalopathie zugesprochen (Gonzales-Sarano und Martin-Garcia, 2005).



**Abb. 1.1: Darstellung der Invasion des HI-Virus ins zentrale Nervensystem.**

Die "Trojan Horse Theory" geht davon aus, dass das HIV durch Invasion in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes sich, ohne durch das Immunsystem erkannt zu werden, replizieren kann. So kann es als blinder "Passagier" die BHS überwinden. Im ZNS infiziert das Virus parenchymale Mikroglia (und evtl. auch Astrozyten). Die immunpathologischen Prozesse führen zur Entstehung von mehrkernigen Riesenzellen, die typisch für eine HIV-Enzephalitis sind. Aktivierte und infizierte Mikroglia/mononukleäre Zellen führen über zytochemische Prozesse zu einer Progression des Inflammationsgeschehens und der neuronalen Schädigung. Schema modifiziert nach Bertoune (2014).

#### 1.1.4 Das simiane Immundefizienz-Virus (SIV)

SIV gilt als Ursprungsvirus für das menschliche Immunschwächevirus HIV. Die erstmalige Isolierung des SIV mit Zeichen einer Immundefizienz gelang 1985 bei Rhesus Affen (*Macacca mulatta*) (Daniel et al., 1985; Kanki et al., 1987). Als natürliche Wirte für das SIV sind Paviane, Mangabenaffen und die grüne Meerkatze bekannt, bei denen das Immunschwächevirus keine klinische Manifestation auslöst. Erst eine interspeziesübergreifende Transmission von evolutionsbedingten Virusrekombinationen auf andere Primatenarten wie Rhesus Affen und Menschen führt zu einem pathogenen Verlauf. Bisher sind mehrere SI-Virusstämme aus mindestens 20 nicht-humanen Primatenspezies aus Zentralafrika isoliert worden. Phylogenetische Analysen führen das HIV-1 auf das Chimpansenvirus SIV<sub>cpz</sub> zurück. Da SIV<sub>cpz</sub> eine Mosaikstruktur aus SIV<sub>rcm</sub> (aus Mangabenaffen) und SIV<sub>gsn</sub> (aus Meerkatzen) besitzt, wird eine cross-spezies Übertragung auf Chimpansen (*Pan troglodytes*) von kleineren Affenarten angenommen, die ihre Beutetiere darstellen (Sharp et al., 1998; Bailes et al. 2003). Die Abstammung von HIV-2 konnte auf SIV<sub>sm</sub> (aus der Makakenart der Halsbandmangaben) zurückgeführt werden (Sharp et al. 2001, Marx et al., 2004). SIV und HIV gehören zu derselben Subgruppe der Lentiviren (Primaten-Lentiviren). Beide verbindet eine große strukturelle Verwandtschaft, die sich in der Übereinstimmung der Organisation ihres Genoms und ihrer Gensequenzen (Hahn et al., 2000) widerspiegelt.

#### 1.1.5 Die SIV-Infektion von Rhesus Affen

Die SIV<sub>mac</sub>-Infektion von Rhesus Affen ist das am häufigsten verwendete Tiermodell, weil der Wirt und das Virus der menschlichen HIV-Infektion/AIDS-Erkrankung sehr ähneln (Ter Meulen et al., 2002; Burudi et al., 2001). Beide Virusstämme zeigen einen hohen Tropismus für CD4 exprimierende Monozyten, Lymphozyten und dendritische Zellen (Desrosiers, 1990; Levy, 1996). Die daraus resultierende Abnahme der CD4-Zellen führt in beiden Wirten zu einem vermehrten Auftreten von Lymphadenopathien, opportunistischen Infektionen, Diarrhoen und Neoplasien. SIV-infizierte Rhesus Makaken können wie HIV-infizierte Menschen motorische und kognitive Störungen entwickeln (Eiden et al., 1994).

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte lympho- und makrophagotrope SIV<sub>6B670</sub> besitzt den Vorteil, dass es einen schnellen Infektionsverlauf und eine höhere Rate an neuronalen Schäden aufweist (Clemens et al., 2008). Es eignet sich besonders für die Untersuchung der Neuropathogenese einer retroviralen Infektion.

Erste typische neuropathologische Veränderungen äußern sich in Form einer Meningoenzephalitis durch perivaskuläre Monozyteninfiltrate, mehrkernige Riesenzellen

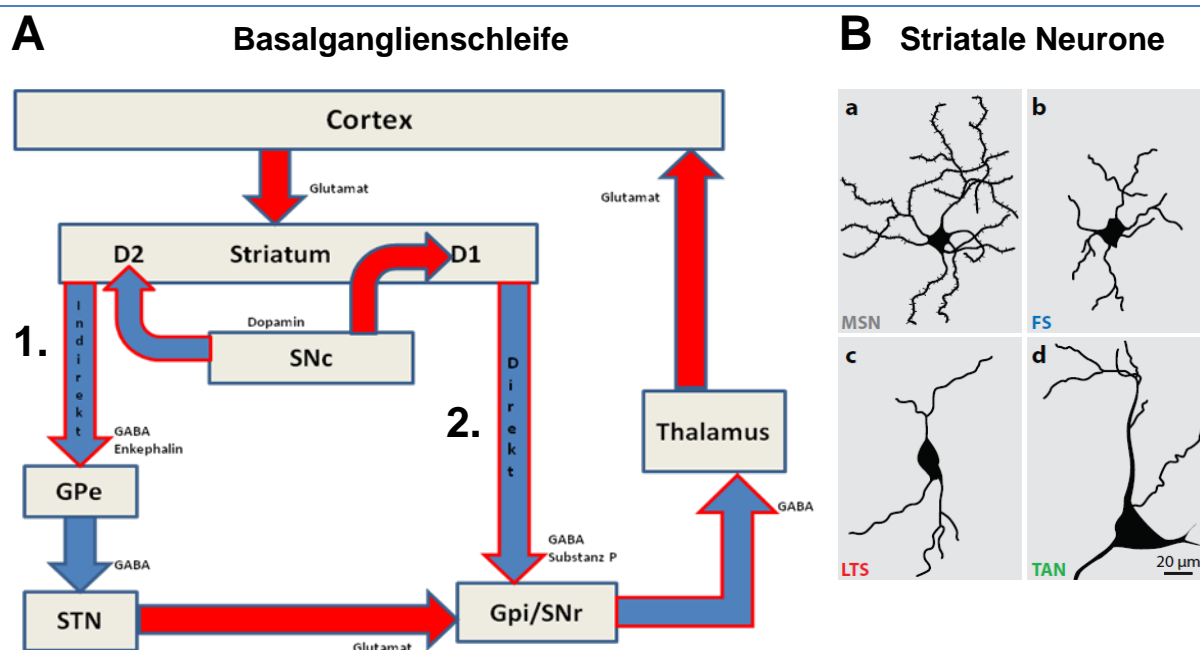
und parenchymale Mikrogliaknötchen. Derartige Läsionen werden begleitet von einer reaktiven Astroglieose (Weihe et al., 1993) und werden besonders in den Basalganglien, der Pons und der weißen Substanz gefunden (Sopper et al., 2002).

## 1.2 Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Die Basalganglien bilden eine funktionelle Einheit neuronaler Regelkreise, die im motorischen System als komplexe Kontrollelemente für die Somatomotorik fungieren. Darüber hinaus sind sie auch bei der Koordination von höheren integrativen kognitiven und emotionalen Prozessen beteiligt (de Long et al., 1990; Groenewegen, 2007). Informationen aus dem gesamten cerebralen Cortex werden in den Basalganglien verarbeitet und über den Thalamus wieder in corticale Bereiche weitergeleitet. Zu den bilateral gelegenen Basalganglien gehören das Striatum, der Globus pallidus mit einer pars externa (GPe) und pars interna (GPi), der Nucleus subthalamicus (STN) und die Substantia nigra mit einer pars compacta (SNc) und einer pars reticularis (SNr) (Gerfen und Wilson, 1996; Kreitzer und Malenka, 2008). Aktuell wird die Funktionalität der Basalganglien mit mindestens fünf Funktionsschleifen erklärt, die unterschiedliche, somatotop geordnete, anatomisch und funktionell getrennte Bereiche der Basalganglien, des Thalamus und des Cortex parallel durchlaufen (Alexander und Crutcher, 1990; Hazrati und Parent, 1994). Entsprechend werden skelettomotorische, okulomotorische, präfrontale und limbische Schaltkreise unterschieden. Diese Funktionsschleifen veranschaulichen die Integrationsfunktion der Basalganglien bei der Auswahl eines motorischen Programms und dienen in der Klinik als Erklärungsmodell für entstehende Symptome bei Funktionsausfällen. Die Steuerung von Bewegungsabläufen wird mit der motorischen Funktionsschleife erklärt (Albin et al., 1995; Crutcher, 1990). In diesem Modell bildet das Striatum die Haupteingangsstruktur, während der GPi und die SNr die Ausgangsstrukturen darstellen. Unterschieden wird ein direkter, bewegungsfördernder Weg (Striatum - GPi) von einem indirekten, bewegungshemmenden Weg (Striatum - GPe - STN - GPi) (Abb. 1). Eine weitere Regulation motorischer Abläufe unter Umgehung des Striatums wird mit dem hyperdirekten Weg erklärt, der als cortico-subthalamico-pallidale Verbindung beschrieben wird (Nambu et al., 2002).

Zu den Basalganglienerkrankungen werden unter anderem das Morbus Parkinson und die Chorea Huntington gezählt. Eine Störung im Wechselspiel der Impulsabgabe wird beispielsweise bei der Parkinson-Krankheit erkennbar. Hierbei entsteht ein dopaminerges (DAerges) Defizit im Striatum durch eine Degeneration DAerger Neurone der SNc, das zu einem Überwiegen des indirekten Weges führt. Die Parkinson-Symptome entstehen durch eine Steigerung der inhibitorischen Aktivität der

Ausgangskerne (hypokinetische Erkrankung). Bei Chorea Huntington vermindert sich die inhibitorische Aktivität der Ausgangskerne (hyperkinetische Bewegungsstörung). Auch werden kognitive Störungen bei pathologischen Veränderungen der Basalganglien beschrieben (Bonelli und Cummings, 2008).



**Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung der Basalganglienschleife unter physiologischen Bedingungen nach Alexander und Crutcher (1990): die cortiko-striato-thalamo-cortikale Feedbackschleife.**

**A:** Rote Pfeile: exzitatorisch; blaue Pfeile: inhibitorisch.

1. Der "direkte Weg": Striatum – Globus pallidus internus (Gpi)/Substantia nigra pars reticularis (SNr). Der Weg wirkt über eine Hemmung der Bewegungsinhibition bewegungsfördernd.

2. Der "indirekte Weg": Striatum – Globus pallidus externus (GPe) – Nucleus subthalamicus (STN) – Gpi/SNr. Der Weg wirkt indirekt bewegungshemmend über eine Förderung der inhibitorischen Ausgangskerne.

DAerge Afferenzen aus der Substantia nigra pars compacta (SNc) wirken über D1- und D2-Rezeptoren modulierend auf beide Wege.

**B:** Schematische Darstellung von klassischen striatalen Neuronentypen nach Kreitzer A.C. (2009).

MSN: Medium Spiny Neuron (GABAerge Projektionsneurone); FS: Fast Spiking Interneuron (cholinerge, grosse Interneurone); LTS: Low Thresholdspiking Interneuron (cholinerge, mittelgrosse Interneurone); TAN: Tonically Active Interneuron (cholinerge Interneurone).

### 1.2.1 Das Striatum

Das Striatum ist das Eingangskerngebiet der Basalganglien. Es gilt als zentrale Schaltstelle motorischer Impulse, die durch Ordnung, Temporegulierung und Koordination von Bewegungsschleifen eine zentrale Rolle bei der Planung und Initiierung von Willkürbewegungen spielt. Es besteht aus einem Caput, einem Corpus und einer Cauda. Es wird anatomisch und funktionell in zwei Subareale unterteilt, die Teil der assoziativen und der sensomotorischen Basalganglienfunktionsschleife sind. Das dorsale Striatum (DS) gliedert sich in den an den Seitenventrikel grenzenden Nucleus caudatus (NC) und das lateral des Pallidums liegende Putamen (Put), die entwicklungsgeschichtlich aus derselben Struktur im Vorderhirn hervorgehen. Sie bilden eine funktionelle Einheit und werden bei Primaten durch die Capsula interna, die zwischen dem Neocortex und dem Thalamus verlaufende Faserbündel enthält, auseinandergedrängt. Das ventrale Striatum (VS) wird auch als Neostriatum bezeichnet und enthält zusätzlich den Nucleus accumbens, einen Teil des Tuberculum olfactorium und das Nucleus amygdaloideus centralis. Dem Begriff "Streifenkörper" liegen die innerhalb der Capsula interna gelegenen Zellbrücken zugrunde. Im Striatum enthalten sind zwei Arten von Kompartimenten: große Teile mit motorischen, ACh-Esterase (AChE)-haltigen Verbindungen (Matrix) und kleinere Abschnitte (Striosomen), die mit dem limbischen System in Verbindung stehen (Crittenden und Graybiel, 2011).

### 1.2.2 Nervenzellen des Striatums

Bei der anatomischen Einteilung bilden Projektionsneurone und Interneurone die hauptsächlichen Neuronenpopulationen des Striatums (Kreitzer, 2009) (Abb. 2).

1. Projektionsneurone: Mit 90-95% bilden GABAerge Projektionsneurone, die wegen der dornenhaften Ausstülpungen ihrer Dendriten auch Medium spiny neurons (MSNs, mittlere Zelldurchmesser 12-20 µm) genannt werden, die Mehrheit der striatalen Neurone. Entsprechend ihrer axonalen Projektionen unterscheiden sich die MSNs sowohl neurochemisch als auch in der Expression von DAergen Rezeptortypen.

- Striatonigrale Neurone verwenden die Neurotransmitter Substanz P und Dynorphin, exprimieren D1- und muskarinerge M4-Rezeptoren. Sie projizieren zur SNr und GPi (direkter Weg).
- Striatopallidale Neurone enthalten Enkephalin, exprimieren D2- und purinerge A2A-Rezeptoren. Sie senden Efferenzen zum GPe (indirekter Weg) (Smith et al., 1998).

Beide Neuronentypen zeigen ähnliche Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch in der Art der Modulation durch ACh und DA (Shen und Surmeier, 2007).

MSNs gelten als Empfangsstation sämtlicher ins Striatum eintretender Afferenzen. So erhalten sie neurochemische Informationen aus dem Cortex (erregende glutamaterge Fasern aus dem motorischen, sensorischen und präfrontalen Assoziationscortices), dem Thalamus, der Area tegmentalis ventralis (DAerge Afferenzen) und aus der SNc (DAerge Neurone hemmen über D2-Rezeptoren den indirekten Weg und aktivieren über D1-Rezeptoren den direkten Weg) (Joel und Weiner, 2000). Diese neurochemischen Impulse entscheiden über die inhibitorisch GABAerge Wirkung der Projektionsneurone des Striatums auf nachfolgende Elemente der Basalganglienschleife.

2. Interneurone: Diese machen nur 5-10 % der Neuronenpopulation aus und werden weiter unterteilt.

- Mittelgroße GABAerge Zellen (physiologische Unterteilung: a. Parvalbumin+, b. Somatostatin+, Neuropeptid Y+, and Nitrit Oxid Synthase+, und c. Calretinin+ Interneurone (Bennet und Bolam 1993; Cowan et al., 1990; Smith und Parent, 1986). Sie unterscheiden sich in ihren neurophysiologischen Entladungsmustern (Kawaguchi et al., 1995). Die TH+ Interneurone werden ihnen zugeordnet.

- Große cholinerge Zellen zeigen eine hohe Spontanentladungsrate (Wilson et al., 1990).

Interneurone erhalten auch glutamaterge Afferenzen aus dem Cortex und dem Thalamus, sie enden an den dendritischen Ausstülpungen der MSNs (Boutons) und anderen Interneuronen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Modulation der striatalen Efferenzen (Tepper et al., 2004).

Diese Einteilungen zeigen die große Heterogenität innerhalb der Projektionsneurone und der Interneurone im Striatum. Zusätzlich zu den unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der Neuronenpopulationen exprimieren sie separate Rezeptoren für DA und ACh.

### **1.2.3 Neurochemie des Striatums**

In den Basalganglien haben die Neurotransmitter die Funktion, den cortikalen Informationsfluss zu ermöglichen und den erforderlichen Bedingungen anzupassen. Innerhalb des Striatums werden über eigenständige, aber trotzdem eng miteinander in Verbindung stehende Transmittersysteme, die inhibitorischen oder exzitatorischen Netzwerke koordiniert. Die wichtigsten, an der neurochemischen Kommunikation der Neurone beteiligten Neurotransmitter sind DA, GABA, Glutamat und ACh.

Die räumliche Organisation der Synapsen an den Neuronen gibt Aufschluss über die Funktionsweise und gegenseitige Beeinflussung der neuronalen Aktivität. So erhalten beispielsweise die in 1.2.2 beschriebenen striatalen MSNs an den Köpfen ihrer



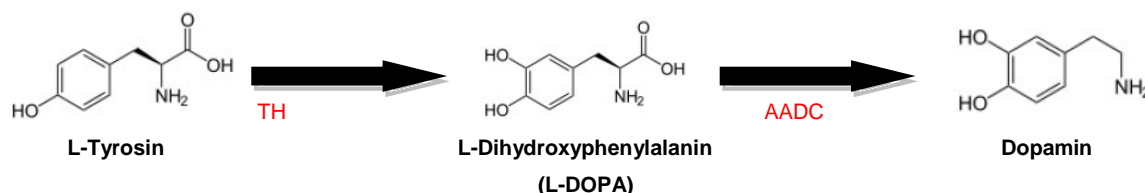
dornenhaften Ausstülpungen vor allem exzitatorische glutamaterge Afferenzen, während an den Dornenhälsen eher DAerge Afferenzen ankommen. Dies führt zu der Annahme, dass die glutamaterge Neurotransmission durch DA moduliert wird (Bolam et al., 1999). Die enge Interaktion der Transmittersysteme zeigt sich auch durch das Vorkommen von Glutamat-Rezeptoren an DAergen Synapsenendigungen und DA-Rezeptoren an der glutamatergen Präsynapse. Beide Rezeptorarten wurden darüber hinaus auch auf GABAergen Projektioneuronen im Striatum nachgewiesen (Tarazi und Baldessarini, 1999).

### **1.2.3.1 Das dopaminerge (DAerge) System im Striatum**

Den Ursprung der dichten DAergen Innervation des Striatums bilden größtenteils die DAergen Neurone der SNc (projizieren ins DS) und der VTA (projizieren ins VS). Hier sei die DA-Synthese anhand der mesostriatalen Neurone beschrieben. Die Synthese erfolgt präsynaptisch an den DAergen Terminalen. Die Aminosäure L-Tyrosin, aus Phenylalanin synthetisiert oder extrazellulär aufgenommen, wird durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) hydroxyliert. Es entsteht L-DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin), das im nächsten Schritt durch das Enzym aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC) decarboxyliert und dadurch zu DA umgewandelt wird. DA wird als aktiver Neurotransmitter über den vesikulären Monoamin-Transporter 2 (VMAT-2) in präsynaptische Vesikel verpackt oder lokalisiert sich als extravesikuläres DA im zytoplasmatischem Kompartiment. Bei physiologischer Stimulation wird DA als neurochemischer Modulator in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Dort erreichen die DA-Moleküle durch Diffusion die postsynaptische Membran striataler Empfängerneurone, deren Rezeptorart über die hemmende (D2-Rezeptor) oder exzitatorische (D1-Rezeptor) Wirkung entscheidet. Hauptprojektionsziele der DAergen Neurone der SNc bilden die MSNs im Striatum. Die MSNs haben die Funktion, die kortikalen Informationen über zwei Signalwege zu den Ausgangskernen der Basalganglien zu leiten.

Wie in 1.2.2 beschrieben ist die Expression von D1- und D2-Rezeptoren auf jeweils einen MSN-Typen beschränkt. Daraus resultiert die unterschiedliche Wirkung von DA auf GABAerge Neurone des Striatums, deren Erregung oder Hemmung die Modulation der direkten (striatonigralen) und indirekten (striatopallidalen) Funktionsschleife ermöglicht. Die synaptische Erregung wird durch die Wiederaufnahme von DA-Molekülen über den membranständigen DA-Transporter (DAT) in die präsynaptische Zellendigung oder deren Abbau zu Homovanillinsäure durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT) beendet.

Überdies ist auch eine neurotoxische Wirkung von DA bekannt. Die leichte Autooxidation von extravesikulärem zytoplasmatischem DA führt zur Bildung freier Radikaler und somit zu oxidativem Stress (Stokes et al., 1999). Freie Radikale zerstören Zellwandbestandteile von Mitochondrien und können zum Zelltod führen (Halliwell, 1992).



**Abb. 1.3: DA-Biosynthese.**

Die Enzyme TH und AADC werden für eine vollständige DA-Synthese benötigt. DOPAerge Neurone exprimieren nur die TH.

Abkürzungen: TH: Tyrosinhydroxylase; AADC: aromatische Aminosäure-Decarboxylase.

### 1.2.3.2 Striatale TH+ Neurone

TH ist als erstes und geschwindigkeitsbestimmendes Enzym an der Synthese von Katecholaminen beteiligt. Es katalysiert unter Verwendung des Cofaktors Tetrahydrobiopterin und molekularem Sauerstoff die Hydroxylierung der Aminosäure L-Tyrosin in die Aminosäure L-DOPA, aus dem entsprechend der enzymatischen Ausrüstung die Neurotransmitter DA, Adrenalin und Noradrenalin gebildet werden können. Das Enzym TH ist in den Zellkörpern und Axontermini von catecholaminergen Neuronen zytoplasmatisch lokalisiert.

Neben den nigrostriatalen DAergen Neuronen, die TH und AADC exprimieren, führten grundlegende Entdeckungen in den letzten Jahren zu einer neuen Einteilung der TH+ Neurone im Striatum. In den Striata von nicht-humanen Primaten (Dubach et al., 1987; Tandé et al., 2006) und Menschen (Cossette et al., 2005; Huot et al., 2007) wurden TH+, aber AADC-negative (AADC-) oder -anteilig -positive Neurone nachgewiesen. Sie wurden als DOPAerge, TH+ Neurone beschrieben, die zusätzlich im Nucleus accumbens und im Cortex lokalisiert sind. Sie scheinen kein VMAT-2 zu exprimieren (Weihe et al., 2006; Ugrumov, 2013; Depboylu, 2014). Die genaue Funktion dieser monoenzymatischen, TH+ Zellen (Weihe et al., 2006) ist unbekannt. In Tiermodellen der Parkinson-Krankheit konnte eine reaktive Zellzahlzunahme dieser TH-Neurone im DAerg

denervierten Striatum gezeigt werden (Tashiro et al., 1989; Meredith et al., 1999; Tandé et al., 2006; Depboylu, 2014). Demzufolge besteht die Annahme, dass diese Neurone eine potentielle L-DOPA/DA-Quelle darstellen könnten (Ugrumov, 2013). Wegen ihrer enzymatischen Ausstattung wäre eine kompensierende DA-Synthese mithilfe von benachbarten AADC+ Nervenfasern (serotoninerger) oder AADC exprimierenden Zellen denkbar (Kerber et al., 2015). Neben einer Verbesserung der durch einen DA-Mangel bestehenden Symptomatik bei neuropathologischen Krankheitsbildern besteht auch die Gefahr, dass Kompensationsmechanismen im DAergen System zu erhöhten, lokal unkontrollierten DA-Konzentrationen führen, die in Abwesenheit von vesikulären Speichermechanismen die neurotoxische Wirkung von DA verstärken.

### **1.2.3.3 Das glutamaterge System im Striatum**

Im Säugetiergehirn ist die Aminosäure L-Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Ca. 80-90% aller cerebraler Neurone sind glutamaterg (Cotman et al., 1981). Glutamat kann aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Aspartat durch die Aspartat-Aminotransferase, aus Glutamin durch eine Glutaminase und aus  $\alpha$ -Ketoglutarat durch die Ornithin-Aminotransferase synthetisiert werden. Wichtige glutamaterge Neurone des Gehirns sind die kortikalen Pyramidenzellen, die unter anderem den Ursprung des Tractus corticostriatalis bilden. Die Glutamat-Freisetzung im Striatum findet in den Axonterminalen von thalamischen und subthalamischen Projektionsneuronen statt. Ferner kommt der Botenstoff Glutamat auch in Gliazellen vor (Fonnum, 1984). Glutamat wird präsynaptisch mittels verschiedenen vesikulären Glutamat-Transporter (VGLUT) in Vesikel verpackt. Glutamat bewirkt über verschiedene Rezeptorarten (v.a. ionotrope NMDA- und metabotrope Rezeptoren), die heterogen in allen Zellgruppen in den Basalganglien vorzufinden sind (Greenamyre, 2001), eine postsynaptische Depolarisation. Die neurochemische Exzitation wird durch Wegdiffusion von Glutamat aus dem synaptischen Spalt limitiert. Hierfür wird über zellmembrangebundene Glutamat-Transporter (EAATS, Excitatory Amino Acid Transporters) ein Diffusionsgradient aufgebaut, der für eine aktive Glutamat-Aufnahme aus dem synaptischen Spalt verantwortlich ist. EAATs kommen größtenteils auf Astrozyten vor, die eine Vielzahl des Glutamats im Rahmen des Glutaminzyklus (hier Austausch von Glutamin zwischen Astrozyten und Neuronen) aufnehmen (Danbolt, 2000; O'Shea, 2002).

Trotz der astrozytären Kontrolle der Glutamat-Spiegel im extrazellulären Raum bewirkt der Botenstoff auch an benachbarten Synapsen eine zusätzliche Modulation der

GABAergen, glutamatergen und monoaminergen Neurotransmission (Sem'yanov, 2005; Hassel und Dingledine, 2006; Drew et al., 2008).

Neben seiner Funktion als exzitatorischer Neurotransmitter hat Glutamat auch neurotoxische Wirkungen und wird daher auch als "Exzitotoxin" bezeichnet (Onley, 1990). Eine übermäßige Stimulation von NMDA-Rezeptoren führt zu einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Nervenzellen und führt zu einer unkontrollierten Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger zytoplasmatischer Enzyme und somit zu einer direkten oder indirekten Schädigung v.a. von postsynaptischen Nervenzellmembranen (Beal, 1992; Rothman und Onley, 1995). Darüberhinaus ist bekannt, dass sie apoptotische und nekrotische Prozesse induzieren können (Lau und Tymiansky, 2010). Eine erhöhte Glutamat-Freisetzung und Aktivierung von NMDA-Rezeptoren wurden bei einer Reihe von akut oder chronisch verlaufenden neurologischen Krankheiten (z.B. akute ischämische Insulte, Epilepsie, Chorea Huntington, Morbus Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Parkinson) nachgewiesen.

#### **1.2.3.4 Das GABAerge System im Striatum**

Das biogene Amin  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS. Es entsteht aus Glutamat mittels der Glutamat-Decarboxylase (GAD). GABA wirkt über  $\text{GABA}_A$ - (membranöser Chloridionenkanal) und  $\text{GABA}_B$ - (metabotrope Rezeptoren, die prä- und postsynaptisch inhibierend wirken) Rezeptoren (De Feudis, 1977; Kerr und Ong, 1995; Barnard et al., 1998). Über 90% der striatalen MSNs sind GABAerge Neurone, die den Ursprung der striatonigralen und striatopallidalen Bahnen bilden. Daneben bilden striatale GABAerge Neurone synaptische Kontakte zu den MSNs und zu anderen benachbarten Interneuronen (Jeahae et al., 2015). Diese GABAergen Verbindungen limitieren und modulieren die cortikale Erregung der MSNs. Je nach Zelltyp kann die inhibitorische Wirkung von GABA im Striatum sowohl zu einer exzitatorischen Antwort führen (Hemmung von GABAerger MSNs) als auch einen inhibitorischen Effekt haben (Unterdrückung der Glutamat-Ausschüttung corticostriataler Neurone). Die Interneurone selbst werden von pallidostriatalen Neuronen beeinflusst. Extrazelluläres GABA wird in Gliazellen oder in die Präsynapse aufgenommen.

#### **1.2.3.5 Das cholinerge System im Striatum**

Auch der Neurotransmitter ACh spielt eine wichtige Rolle bei der Basalganglienfunktion. Das Enzym Cholinacetyl-Transferase (ChAT) katalysiert die Synthese von ACh, indem

es die Acetylgruppe aus Acetyl-CoA auf Cholin überträgt (Fonum und Sorensen, 1972). Durch sein ubiquitäres Vorkommen in cholinergen Neuronen, eignet sich ChAT zu deren Detektion und Visualisierung. Quantifizierte ChAT-Reduktionen gelten als Indiz für eine cholinerge Dysfunktion (Mesulam et al., 1984).

Mittels des vesikulären ACh-Transporters (VAChT) wird ACh in neurosekretorische Speichervesikel verpackt. Nach seiner Freisetzung in den synaptischen Spalt bindet ACh im Striatum an nikotinerge (ligandengesteuerte Ionenkanäle, nAChR) oder an muskarinerge Rezeptoren (metabotrope Membranproteine, mAChR) (Zhou et al., 2002; Changeux, 2010). Das Enzym AChE spaltet ACh in seine Bestandteile Cholin und Acetat. Obwohl cholinerge Neurone nur 1-3% der Neurone im Striatum darstellen, bilden sie eine der am stärksten mit ACh ausgestatteten Region im Gehirn (Graybiel, 1990; Mesulam et al. 1992; Contant et al., 1996). Die cholinergen striatalen Interneurone werden aufgrund ihrer autonomen, kontinuierlich-langsam Aktivität als tonisch-aktive Neurone (TAN: Tonically Active Neurons) bezeichnet (Benett und Wilson, 1999; Apicella, 2007). Sie treten in Kontakt mit DAergen Neuronen der SNc und der VTA (Zhou et al., 2002). Die cholinergen striatalen Interneurone werden in ihrer Entladungsrate über viele Mechanismen reguliert, die das komplexe Zusammenspiel der neurochemischen Modulation im Striatum verdeutlichen. So findet cholinerge Transmissionskontrolle über einen konzentrationsmindernden, hohen AChE-Gehalt im Striatum und über eine negative Rückkopplung durch muskarinerge M4-Rezeptoren (Ding et al., 2006) statt. Auch DA wirkt über zusätzlich an den Interneuronen vorhandenen D2- (vermindern die synaptische Entladungsrate) und D5-Rezeptoren (an somatodendritischen Synapsen, erhöhen die Entladungsrate) modulatorisch auf die tonische ACh-Aktivität (Yan et al., 1997; Pisani et al., 2000). Darüberhinaus werden cholinerge Interneurone aus thalamischen und kortikalen Strukturen über inotrope Glutamat-Rezeptoren und GABAerge-Rezeptoren reguliert (Calabresi et al., 2000). Funktionsstörungen im striatalen cholinergen System spielen eine Rolle bei Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Chorea Huntington.

#### **1.2.3.6 Auswirkungen einer HIV-Infektion auf das DOPAerge/DAerge und cholinerge System im Striatum**

Im ZNS verursacht eine HIV-Infektion direkt durch die Toxizität seiner viralen Proteine und indirekt durch die Aktivierung von Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten neuronale Schäden und Dysfunktionen. Wenngleich keine Region im Gehirn von einer HIV-Infektion verschont bleibt, sind die Basalganglien ein wesentlicher Ort für die Virusreplikation und HIV-assoziierte Neuropathologie (Kumar et al., 2009). Menschen

mit HIV/AIDS haben eine Vielzahl von neurologischen Problemen, von denen einige auf eine abnormale, DAerge Transmission zurückgeführt wurden. Dazu zählen die subcortikale Demenz, Parkinson-Symptome und Psychosen. Eine Vielzahl von Publikationen weisen auf eine durch die HIV-Infektion ausgelöste nigrostriatale Dysfunktion hin. Klinische Manifestationen äußern sich bei untersuchten Patienten und im Tiermodell in Form von kognitiven und motorischen Defiziten (Berger und Arendt, 2000; Koutsilierie et al., 2002). In allen untersuchten Hirnarealen wurden bei Patienten mit HAD erniedrigte DA-Konzentrationen gemessen (Sarder et al., 1996). Besonders war dies im Putamen, dem Caudatus, dem Globus pallidus und der Substantia nigra der Fall. Untersuchungen an humanen Postmortem-Hirngewebe geben Hinweise, dass die cerebrale Reduktion der DA-Konzentration mit einer Degeneration der DAergen Neurone in der Substantia nigra korreliert (Reyes et al., 1991; Ioth et al., 2000). Dies erlaubt die Annahme, dass der DA-Gehalt in verschiedenen Hirnarealen durch die DA-Produktion in der Substantia nigra reguliert wird (Kumar et al., 2009). Darüber hinaus fanden sich bei SIV-infizierten Rhesus Makaken bereits im asymptomatischen Frühstadium erniedrigte DA-Konzentrationen in den Basalganglien (Scheller et al., 2005). Im Rattenmodell der HIV-Infektion konnte gezeigt werden, dass Parkinson-ähnliche Symptome durch das bereits in der frühen Phase der Infektion die BHS passierende HIV-Oberflächenprotein tat verursacht werden können. Das tat-Protein blockiert dabei selektiv die Genexpression der TH in den DAergen Neuronen des Mittelhirns der Ratte (Zauli et al., 2000). Eine Reduktion der TH-Faserdichte wurde im Hirngewebe von Patienten mit HIVE nachgewiesen (Gelman et al., 2006). Mittels moderner funktioneller Bildgebung konnte bei Therapie-naiven HIV-Patienten bereits in der asymptomatischen Phase ihrer Erkrankung erhöhte DA-Konzentrationen im Striatum nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich keine adaptiven Anpassungen der DA-Transporter und DA-Rezeptoren. Die dadurch resultierende Verstärkung der neurotoxischen Wirkung von DA wurde als ein möglicher Grund für die im Laufe einer HIV-Infektion bekannten fortschreitenden Störung des DA-Systems im Striatum gesehen (Scheller et al., 2010).

HIV-induzierte Störungen des cholinergen Systems werden mit kognitiven Dysfunktionen in Verbindung gebracht. ChAT fungiert als biochemischer Marker kognitiver Funktionen (Sakurada et al., 1990). Eine dramatische Reduktion der ChAT-Dichte wurde bereits im Frühstadium der Infektion im Putamen SIV-infizierter Rhesus Affen (Koutsilierie et al., 2000) gezeigt. Die neurochemische Bedeutung von Veränderungen des cholinergen Systems im Striatum bei einer HIV-Infektion sind von Bedeutung bei der HAD, HIVE und HIV-induzierten motorischen Störungen. Eine Reduktion der corticalen und hippocampalen cholinergen Innervation wurde für die SIVE beschrieben (Depboylu et al., 2011).

### 1.3 Vesikuläre Speicherung von Neurotransmittern

Die vesikuläre Speicherung und darauf folgende Freisetzung von Neurotransmittern spielt eine zentrale Rolle bei der neurochemischen Signalvermittlung. Vorteile dieser vesikulären Speicherung sind deren Schutz vor enzymatischem Abbau und die ausreichende Ausstattung der Neurone mit Botenstoffen bei gesteigerter Aktivität. Darüber hinaus haben vesikuläre Speicher die Funktion, Nervenzellen vor eventuellen toxischen Wirkungen direkt durch die Neurotransmitter zu schützen, wie es für DA bekannt ist (Nickell et al., 2014). Synaptische Vesikel (SV) haben einen Durchmesser von 40-80 nm. Ihre Membran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die Membranproteine mit unterschiedlichen Funktionen enthalten. Die Mehrzahl bilden die für die Exozytose essentiellen Proteine, während Transporterproteine mit nur etwa 10-15% vertreten sind. Vesikuläre Transporterproteine transportieren die Neurotransmitter über die vesikuläre Membran ins Lumen der Vesikel. Sie kontrollieren nicht nur die Qualität und Quantität des Vesikelinhalts, sondern sind auch an der dynamischen Regulation der Neurotransmission beteiligt (Eiden, 2000). Jeder Vesikel ist nur mit ein bis zwei Energie (ATP)-verbrauchenden vesikulären ATPasen (v-ATPase) ausgestattet, die den für den aktiven Transport der Neurotransmitter in die Vesikel erforderlichen Protonengradienten aufbauen. Folglich ist die Ausstattung der SV mit vesikulären Transporterproteinen und ATPasen maßgeblich für die Regulation der Speicherung von Neurotransmittern (Takamori et al., 2006; Fei et al., 2008).

SV lassen sich in zwei Klassen einteilen: Die "dense core"/"large dense core" Vesikel (LDCVs, große elektronendichte Vesikel, entstammen dem trans-Golgi Netzwerk im Zellsoma, speichern Peptide und Hormone, sind 70-300 nm in Durchmesser) und die "small synaptic vesicles" (SSVs, entstammen aus Kompartimenten der endosomalen Synapsenendigung, speichern niedermolekulare Neurotransmitter, sind 40 nm in Durchmesser, in neuroendokrinen Zellen werden deren Analoga als "small synaptic like vesicles" bezeichnet). Neuronale SSVs speichern ACh, Glutamat, GABA und Glycin (Südhof und Jahn, 1991; Edwards, 1992). VMAT-2 als Transporterprotein für monoaminerge Transmitter ist im Striatum größtenteils in SSVs lokalisiert (Nirenberg et al., 1997; Fei et al., 2008).

Die klassischen Neurotransmitter werden unabhängig vom Vesikeltyp über verschiedene Transporterproteine in Vesikel verpackt. Als spezifische Transporterproteine gelten für Glutamat die VGLUTs (vesikuläre Glutamat-Transporter), für ACh der VACHT (vesikulärer ACh-Transporter), für Monoamine die VMATs (vesikuläre Monoamin-Transporter) und für GABA der VGAT (vesikulärer GABA-Transporter).

### 1.3.1 Ausgewählte vesikuläre Transporterproteine

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der SIV-Infektion und deren antiretrovirale Behandlung auf vesikuläre Transmittersysteme im Striatum auf histomorphologischer Ebene untersucht. Dysfunktionen in der vesikulären Speicherung von Neurotransmittern werden mit der Neuropathogenese von einer Reihe von Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Die biochemischen Mechanismen, die während einer HIV-/AIDS-Erkrankung zu einer Dysfunktion der DAergen Neurotransmission führen, sind nicht gänzlich verstanden (Berger und Arendt, 2000; Koutsilieri et al., 2001; Wang et al., 2004; Kumar et al., 2009; Shapshak et al., 2011). Obwohl die vesikuläre Speicherung von Neurotransmittern eine neuroprotektive Funktion innehält, ist sie in der HIV-Neuropathogenese kaum erforscht.

In Anbetracht der Tatsache, dass sie bei der Pathogenese von Neuro-AIDS/HIV kaum erforscht sind, werden hier zusätzlich Arbeiten vorgestellt, die die Bedeutung einer Transporterproteindysfunktion verdeutlichen.

### 1.3.2 Der vesikuläre Monoamin-Transporter 2 (VMAT-2)

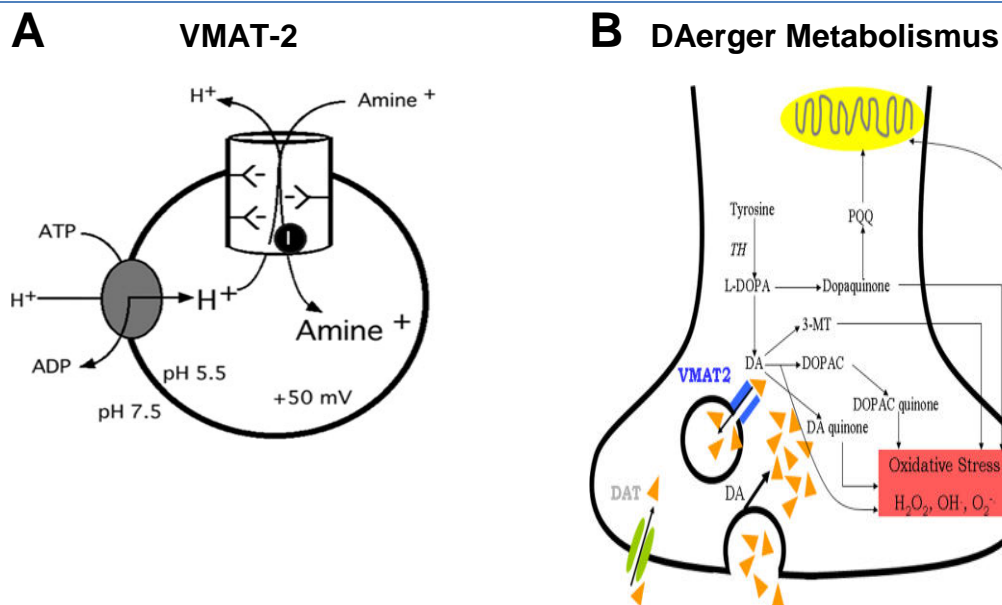
Dem Genlocus entsprechend werden die VMATs zusammen mit dem ihnen genetisch verwandtem VACHT der SLC-18-Transporterproteinfamilie zugeordnet. Zu den monoaminergen Neurotransmittern gehören catecholaminerge und serotonerge Botenstoffe. Im Säugerorganismus existieren zwei Isoformen von vesikulären Monoamin-Transportern, VMAT-1 (SLC-18A1) und VMAT-2 (SLC-18A2) (Eiden und Weihe et al., 2004). Phylogenetische Untersuchungen teilen die VMATs einer größeren Familie von Transporterproteinen, den TEXANs (Toxic-extruding-antiporter-system), zu (Schuldinger et al., 1995). In diesem Modell bedienen sich die strukturell sehr ähnlichen Transporterproteine von Prokaryonten und Eukaryonten an demselben protonengesteuerten Antiportersystem (Abb. 1.4), das bei Prokaryonten allerdings die Funktion der Toxinausschleusung aus der Bakterienmembran hat und auch mit der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen in Verbindung gebracht wird (Schuldinger et al., 1995). VMAT-1 und VMAT-2 besitzen eine 78%ige Homologie ihrer Aminosäuresequenzen. Die größte Divergenz existiert in ihrer luminalen Schleife, die bei VMAT-2 einen größeren Glykolisierungsgrad aufweist (Erickson et al., 1996). Sowohl VMAT-1 als auch VMAT-2 akzeptieren Monoamine als physiologische Substrate (Peter et al., 1994). Adulte humane und rodente Gehirne exprimieren ausschließlich VMAT-2 (Schäfer et al., 2013). Im ZNS findet sich VMAT-2 in allen DAergen, adrenergen, noradrenergen, serotonergen und histaminergen Zellgruppen. Die DAergen Zellgruppen in der SNc sowie in der VTA zeigen eine besonders starke Expression von VMAT-2.



VMAT-1 hat eine ähnliche Struktur und Funktion, erkennt aber Histamin nicht als Substrat und fehlt im ZNS.

Grundlegende Forschungsarbeiten der letzten Jahre erbrachten neue Erkenntnisse über die Aktivität und Bedeutung von VMAT-2. VMAT-2+ Nervenendigungen im Gehirn können mithilfe von  $^{11}\text{C}$ -DHTBZ (Dihydrotetrabenazin, PET-Ligand) visualisiert werden. Solche PET-Untersuchungen an Patienten mit Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Schizophrenie und auch an Gehirnen von gesunden Probanden zeigen eine dynamische Regulierung der an der Katecholaminsynthese beteiligten Enzyme des Gehirns. VMAT-2 hingegen erwies sich als ein Protein mit einer statischen Position. Die Menge von VMAT-2 kann demnach mit der Anzahl der vorhandenen monoaminergen Nervenendigungen in bestimmten Gehirnregionen gleichgesetzt werden (Frey et al., 1996; Suzuki et al., 2001; Zubieta et al., 2000,2001; Bohnen et al., 2006). Arbeiten, die für die VMAT-2-Visualisierung TBZ (Tetrabenazin) als Liganden verwendeten, zeigten eine Reduktion der VMAT-2+ Dichte bei fortgeschrittener Parkinson-Krankheit (Brown et al., 2001). TBZ inhibiert VMAT-2 ähnlich stark wie Reserpin, hat aber den Vorteil, dass es keine Affinität für VMAT-1 besitzt. Der Nachteil von TBZ besteht darin, dass es im Vergleich mit Katecholaminen eine höhere Affinität für VMAT-2 aufweist, und dass die Katecholaminkonzentration auch durch eine direkte Interaktion mit TBZ verändert wird. Dies führt dazu, dass nur unspezifische Aussagen über die VMAT-2-Funktion getroffen werden können (Killborn et al., 2010).

Entsprechend seiner phylogenetischen Abstammung vermittelt VMAT-2 eine neuroprotektive Funktion, indem es endogene und exogene Toxine durch vesikuläre Aufnahme abpuffern kann. Abgesehen von DA, können auch Toxine wie MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6 Tetrahydropyridin) und Methamphetamin über VMAT-2 in Vesikel verpackt werden (Guillot et al., 2009). Die Bedeutung einer Detoxifizierung durch VMAT-2 konnte im Mäusemodell unterstrichen werden. Eine genetische Reduktion der VMAT-2 Expression zeigte bei zusätzlicher MPTP-Behandlung eine größere Schädigung der DAergen Nerventerminalen im Striatum (Takahashi et al., 1997; Gainetdinov et al., 1998). Ein Defekt von VMAT-2, der zu einem Verlust DAerger Fasern im Striatum von Menschen und Primaten führt, wird als möglicher früher Mechanismus bei der Entstehung des Parkinson-Krankheit diskutiert (Pifl et al., 2014).



**Abb. 1.4: Illustrationen von VMAT-2 und dem DAergen Metabolismus.**

**A:** Darstellung des VMAT-2-Protonenantiportersystems, der die vesikuläre Aufnahme von Monoaminen ermöglicht, nach Eiden und Weihe (2011).

**B:** DAerger Metabolismus und Entstehung von DAergen Radikalen, die oxidativen Stress verursachen, nach biomedsearch.com.

### 1.3.3 Der vesikuläre ACh-Transporter (VAChT)

Der VACht (SLC18-A3) ist genetisch mit den VMATs verwandt und transferiert ACh in die SVs. Hierbei werden zwei Protonen aus dem Vesikellumen gegen ein zytosolisches ACh-Molekül ausgetauscht (Schuldinger et al., 1995). Sein Vorkommen ist auf die SSVs des zentralcholinergen und peripheren Nervensystems, das motorische, kognitive und vegetative Prozesse vermittelt, beschränkt (Gilmore et al., 1996; Weihe et al., 1996). VACht und die für die ACh-Synthese essentielle ChAT werden als Marker für cholinerge Neurone und deren Fortsätze verwendet (Schäfer und Weihe, 1994, 1998). Außergewöhnlich ist die Kolo-kalisation von dem humanen VACht-Gen mit dem ChAT-Gen auf Chromosom 10q11.2. Genauer gesagt ist die VACht-kodierende Sequenz innerhalb des ChAT-Genlokus enthalten. Dementsprechend werden in cholinergen Neuronen beide Gene vom sogenannten "Cholinergen Genlokus" gesteuert. Diese präzise Koregulation ermöglicht die Aufrechterhaltung der cholinergen Funktion (Erickson et al., 1994; Weihe et al., 1998). In vitro Analysen deuten darauf, dass VACht ein sehr langsamer Transporter ist (Varoqui und Erickson, 1996), der auch das Recycling von synaptischen Vesikeln aus der präsynaptischen Membran limitiert. VACht soll zudem die Ausschüttungsrate von ACh regulieren (Song et al., 1997; Prado et al., 1998).

2006; Lima et al., 2010). Tatsächlich konnten auch pharmakologische Experimente, die das für eine VACHT-Inhibition spezifische tertiäre Amin Vesamicol benutzen, auch die Bedeutung von VACHT für die Regulation der zentralen cholinergen Transmission aufzeigen. Zusätzlich wurden viele Anstrengungen unternommen, um Vesamicol-Analoga für die Visualisierung von cholinergen Neuronen per funktionelle Nuklearbildgebung (PET, SPECT) möglich zu machen. Cholinerge Neurone im Striatum spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Motorik und des Belohnungssystems. Die überraschende Entdeckung, dass sie - zumindest in der Maus - neben VACHT auch VGLUT-3 exprimieren (Schäfer et al., 2002; Boulland et al., 2004) führte zu der Frage, inwieweit dieser auch die ACh-Speicherung in SVs mit beeinflusst. Eine selektive VACHT-Blockierung führte, im Gegensatz zu dem erwarteten cholinergen Defizit im Striatum, vielmehr zu einer, wie bei einer Hochregulierung von DA-Rezeptoren bekannten, Verstärkung der Sensitivität striataler MSNs gegenüber DA und DA-Agonisten (Guzman et al., 2011). Diese Konstellation bietet eine neue Therapieoption mit VACHT als ein möglicher Angriffspunkt in der Behandlung der Parkinson-Krankheit, die durch ein DA-Defizit und eine verstärkte cholinerge Aktivität striatal gekennzeichnet ist.

#### **1.3.4 Der vesikuläre Glutamat-Transporter 1 (VGLUT-1)**

Die Aufnahme von Glutamat in sekretorische Vesikel wird auch durch einen von der v-ATPase angetriebenen Austausch mit Protonen durch VGLUTs gewährleistet. Die VGLUTs gehören zu der SLC17-Transporterproteinfamilie, in der drei Formen (VGLUT-1 bis -3) beschrieben werden. VGLUT-1 und VGLUT-2 werden in unterschiedlichen glutamatergen Neuronen des ZNS exprimiert. Ihre Verteilung ist komplementär. VGLUT-3 hingegen ist in verschiedenen cholinergen und monoaminergen Zelltypen mit VACHT und VMAT-2 kolokalisiert (Schäfer et al., 2002; Reimer und Edwards, 2004; Fei et al., 2008). Das spricht für die zusätzliche Rolle von Glutamat als Kotransmitter. Alle drei Formen sind spezifisch für ihr Substrat Glutamat. Es werden keine anderen Aminosäuren ins Vesikellumen transportiert (Maycox et al., 1990). Plasmamembrantransporter (EAATs) haben begründet in der zytotoxischen Wirkung von extrazellulärem Glutamat eine stärkere Affinität für Glutamat als die vesikulären VGLUTs. Eine hohe zytoplasmatische Konzentration an Glutamat (ca. 100 mM) sorgt für eine ausreichende Sättigung der VGLUTs (Danbolt, 2001). Auf einem Vesikel befinden sich ca. 10 Kopien der VGLUTs (Takamori et al., 2006), wobei für die Füllung der Vesikel eine mRNA-Kopie ausreichend ist (Daniels et al., 2006). Ob der VGLUT-Überschuss in der Vesikelmembran ein Sicherheitssystem für die Erhaltung der SVs

darstellt oder gar das Recyclen von SVs verlangsamt und damit eine limitierende Rolle hat, ist unklar. Im adulten Gehirn ist VGLUT-1 das am häufigsten synthetisierte Transporterprotein für Neurotransmitter. VGLUT-1 gilt als Marker glutamaterger kortikaler Nervenendigungen (Fujiyama et al., 2004). Auch zeigt sich eine starke Immunreaktivität für VGLUT-1 im Striatum (Hisano, 2003; Schäfer et al., 2013). Für die essentielle Bedeutung der glutamatergen Neurotransmission spricht, dass VGLUT-1-Deletionsmutanten starke neurologische Beeinträchtigungen haben und bedingt lebensfähig sind. Passend zu dem ubiquitärem Vorkommen der VGLUTs im ZNS und deren Aufgabe, die Glutamat-Neurotransmission zu regulieren, gibt es Beweise für Veränderungen der VGLUT-Expression bei diversen neurologischen Erkrankungen.

### **1.3.5 Der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT)**

Im Gehirn dominiert GABA als inhibitorischer Botenstoff, während im Rückenmark und im Hirnstamm neben GABA auch Glycin vorkommt. Für die vesikuläre Speicherung von beiden Neurotransmittern in SSVs ist bis heute nur ein Transporterprotein, der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT), der auch als Transporter für inhibitorische Aminosäuren (VIAAT) bezeichnet wird, bekannt (Chaudhry et al., 1998; Eiden et al., 2004). VGAT gilt als Marker für inhibitorische Nervenendigungen. Seinem Genlokus entsprechend ist er der einzige Vertreter der SLC32-Transporterproteinfamilie. Diese gehört zusammen mit den SLC36- und SLC38-Proteinfamilien zu der für Säugetiere spezifischen Superfamilie der protonengesteuerten Aminosäuretransporter. Die Zuteilung verdeutlicht die evolutionäre Distanz von VGAT zu SLC17- (VGLUT-1 bis -3) und SLC18-Transporterproteinfamilien (VMAT-1 und -2, VACHT), die im Gegensatz zu VGAT Homologien mit bakteriellen Transporterproteinen aufweisen (Gasnier, 2004). Topologieanalysen verdeutlichen, dass die VGAT-Transmembrandomänen sich in ihrem Aufbau von anderen v-ATPasen unterscheiden. Die bei VGAT gefundene ungerade Anzahl an Transmembranproteinen lässt eine enge Verwandtschaft zu den in Pflanzen vorkommenden Aminosäurepermeasen vermuten (Wipf et al., 2002). Desweiteren weist der C-Terminus von VGAT im Gegensatz zu anderen v-ATPasen in das Vesikellumen (Martens et al., 2008). Das spricht dafür, dass VGAT durch andere Mechanismen reguliert wird.

Der Transportmechanismus für die vesikuläre Speicherung durch VGAT konnte in neueren Arbeiten gezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass VGAT ein vesikulärer Chlorid- und GABA/Glycin-Kotransporter ist, der von einem positiven, intraluminalen Membranpotential (im Gegensatz zu den protonengetriebenen Transporterproteinen, die einen pH-abhängigen Gradienten aufbauen) angetrieben wird (Juge et al., 2009). Zudem

bestehen Hinweise, dass VGAT zusätzlich die über GABA-Rezeptoren auch inhibitorisch wirkende Aminosäure  $\beta$ -Alanin, mit demselben Mechanismus für die vesikuläre Aufnahme von GABA und Glycin, aufnehmen kann (Juge et al., 2013).

Auch bei VGAT ist es durch sein ubiquitäres Vorkommen im ZNS und seiner Rolle in der inhibitorischen Neurotransmission offensichtlich, dass dessen Defekte/Funktionsverluste zu schweren neurologischen Ausfällen führen können. Ein Verlust von VGAT bei Knockout-Mäusen führte zu einer Sterblichkeit in frühen Embryonalstadien, zur Bildung von Omphalozelen, gekrümmten Körperhaltungen und zu einer Gaumenspalte (Saito et al., 2010). Es existieren kaum Forschungsarbeiten über mögliche Auswirkungen von inflammatorischen Prozessen/Infektionen auf die VGAT-Funktionalität.

## 2 Zielsetzung und Fragestellung

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer lentiviralen Infektion und deren antiretrovirale Behandlung auf Prozesse der vesikulären Neurotransmission im Striatum des Rhesus Affen am SIV-Modell zu untersuchen. Die Annahme, dass eine mögliche Dysfunktion in der vesikulären Speicherung von Neurotransmittern die Neuropathogenese von HIV/AIDS zusätzlich verursacht/begründet oder auch bei einer inadäquaten Therapie zu deren Progression beiträgt, soll durch immunhistochemische Analysen untersucht werden. Hierzu wurden im SIV-Modell der HIV-Infektion die synaptische Faserdichte von vesikulären Neurotransmitterproteinen, die Anzahl der cholinergen und DOPAergen/DAergen Neurone und das Ausmaß der Neuroinflammation im Striatum quantifiziert. Reversible und irreversible Veränderungen wurden durch den Einsatz einer ZNS-permeablen antiretroviralen Therapie aufgedeckt.

Dabei wurden im Speziellen folgende Fragen untersucht:

- Wie stellt sich das Neuroinflammationsgeschehen (mikrogliale und astrozytäre Zellreaktionen) im Striatum bei einer lentiviralen Infektion dar?
- Wie wirkt sich eine lentivirale Infektion auf die DAerge Faserinnervation und auf DOPAergen/DAerge Neurone im Striatum aus? Handelt es sich hierbei um eine Innervationsdefizit oder um einen neuronalen Zellverlust?
- Wie wirkt sich eine lentivirale Infektion auf das cholinerge System im Striatum aus? Gibt es unterschiedliche Veränderungen für synthetisierende Enzymen und vesikuläre Transmitterproteine?
- Inwieweit ist die striatale Expression der vesikulären Transmittertransporter durch eine lentivirale Infektion verändert? Wodurch kann eine unterschiedliche Beeinträchtigung erklärt werden?
- Ist die Behandlung mit einer lipophilen antiretroviralen Substanz effektiv, Veränderungen von Transmittersystemen im Striatum zu normalisieren?

### 3 Material und Methoden

Paraffinschnitte des Striatums von SIV-infizierten Rhesus Makaken wurden immunhistochemisch untersucht. Verglichen wurden dabei eine gesunde nicht infizierte Kontrollgruppe mit einer Gruppe von Rhesus Affen, die mit SIV inokuliert wurden aber nicht an AIDS erkrankten, und mit einer Gruppe an AIDS erkrankter Affen. Als vierte Gruppe wurden Affen untersucht, die an AIDS litten und antiretroviral mit 6-CI-ddG behandelt wurden. Zur Quantifizierung wurden standardisierte immunhistochemische Methoden mit etablierten Antikörpern verwendet. Koexistenzen wurden mittels Immunofluoreszenz-Doppelmarkierung analysiert.

Experimentelle Gruppen von Rhesus Makaken:

- 1) Kontrollgruppe (Control)
- 2) SIV-infizierte, aber nicht erkrankte Gruppe (SIV/-AIDS)
- 3) SIV-infizierte und an AIDS erkrankte Gruppe (SIV/+AIDS)
- 4) SIV-infizierte und an AIDS erkrankte sowie mit 6-CI-ddG behandelte Gruppe (SIV/+AIDS/+ddG)

#### 3.1 Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Dippinggefäße	Amersham, Buckinghamshire, UK
Färbeküvette nach Schiefferdecker	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe und Hellendahl
Inkubationskammern	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Laborflaschen	Schott AG, Mainz
Messbecher und –zylinder	Schott AG
Objektträger (SuperFrost) 76 x 26 mm & Deckgläser	ROTH, Karlsruhe
Papierfilter	Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK
Super PAP Pen	Immunotech, Beckman Coulter Company

Chemikalien	Hersteller
Aceton	ROTH
Bovines Serumalbumin	Serva, Heidelberg
DePex	Serva
3-3, Diaminobenzidin	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Riedel de Haen, Seelze
Ethanol	ROTH
Giemsa Färbelösung	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck
Natriumacetat	Merck
Di-Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Tri-Natriumcitrat	Merck
Tris-hydrochlorid	ROTH
Natriumcitrat-dihydrat	Merck
Di-Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natronlauge	Baker, Deventer, Holland
2-Propanol, Rotipuran	ROTH
Salzsäure	Merck
TESAP (3-Triethoxy-propylamin)	Merck
Tritom X100	Sigma
Tyramid Reagent Pack	Perkin Inc., Waltham, MA, USA
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite Avidin-Biotin-Blocking Kit	Vector Laboratories Inc.
Wasserstoffperoxid	ROTH
Xylol	Merck



Geräte und Instrumente	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Neuberger
Hybridisierungsöfen 400 HY-E (60°C)	Bachofer, Reutlingen
Foto-Leuchttisch-Kamera	Northlight, Nikon
IBM Computer	
Inkubationsöfen (16°C/37°C)	WTB Binder Labortechnik, Reiskirchen
Kochplatte	Rommelsbacher
Laborwaage PT 3010	Sartorius AG, Göttingen
Laserscanningmikroskop (Olympus BXWI)	Olympus Optical Co., Hamburg
Laser für das Laserscanningmikroskop (Omnichrome Series 43, Modell 643-OLYM-A03)	Melles Griot Laser Group, Carlsbad, USA
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Olympus BX40 F Stereomikroskop	Olympus Optical Co.
Olympus Fluoview BX50WI, Konfokales Laserscanningmikroskop	Olympus Optical Co.
Olympus Provis AX70 Stereomikroskop	Olympus Optical Co.
pH-Meter CG 840 B	Schott AG
Reinstwasseranlage (Milli-Q)	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Rotationsmikrotom HM 35	Microtom International GmbH, Walldorf
SPOT RT3 Mikroskop Kamera (Slider 2.3.1)	Spot Imaging Solutions, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, USA
Tissue-Tek Paraffin-Ausbettstation	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holland
Tissue-Tek VIP Gewebe Einbettautomat	VOGEL, Medizinische Technik und Elektronik, Gießen
Trockenplatte (Präzitherm)	Störck Tronic, Stuttgart
UEC-Force IV Mikroliterzentrifuge	UNIEQUIP Laborgeätebau und Vertrieb GmbH, Martiensried
Umluftofen (Typ UT 6)	Thermo Electron Corporation, Langenselb
Vortex	IKA Labortechnik

Software	Hersteller
Adobe Photoshop	Adope Systems GmbH, München
FluoView	Olympus optical C.
Graph Pad Prism 4	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ 1.44	National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA
MCDI M4 Image Analysis System	Imaging Research, St. Catharine, ON, Kanada
Microsoft Excel	Microsoft Corportation, Redmont, WA, USA
Spot Advanced Version 3.5.7.1	Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Charakterisierung der Versuchstiere und Gruppierungen

Junge Rhesus Makaken aus dem, von der American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care anerkannten, BIOQUAL Animal Facility in Rockville (MD, USA) wurden für die Versuchsreihe gehalten. Eine Infektion der Tiere mit simianen Retrovirus -1 und -2 oder Herpes Virus Simiae wurde vor Versuchsbeginn ausgeschlossen. Für die Virusinokulation wurde das einst von da Cunha et al. (1995) beschriebene SIV<sub>δB670</sub>, der in humanen mononukleären Zellen (hPBMC) kultiviert und bis zu seiner Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert wurde, verwendet. Das zellfreie SIV<sub>δB670</sub>, stellt einen neurovirulenten rekombinanten Viruskomplex dar, der Makrophagen- und T-Zell-trophische Viren enthält (Zink et al., 1997). Die Virusinokulation erfolgte per intravenöser Gabe einer zehnfach infektiösen Dosis für Rhesus Makaken. Die Bestätigung einer nachhaltigen Infektion gelang durch Detektion von SIV *p26* mittels ELISA und Virusisolation aus PBMC (Rausch et al., 1994). Die Diagnose von AIDS wurde bei den Rhesus Makaken durch Symptome wie Appetitlosigkeit mit einer Reduktion des Körpergewichts bis zu 10%, opportunistischen Infektionen, Auftreten von Haut- und Schleimhauteffloreszenzen und einer zu einer Flüssigkeitssubstitution notwendigen Diarrhoe gestellt (Eiden et al., 1992). In der Zeitdauer von 4,5 bis 8 Monaten zwischen Virusinokulation und Tötung litten die erkrankten Tiere weiterhin unter kognitiven und motorischen Beeinträchtigungen, Apathie, Inkontinenz und Anämie.

Sechs Affen dienten als Kontrollgruppe (Control), die nicht inokuliert wurden (MO44, MO45, MO50, MO69, MO87, MO88). Zur Zeit der Tötung und Gewebeentnahme zeigten dreizehn Affen eine hohe Virämie und AIDS (MO46, MO70, MO71, MO72, MO73, MO74, MO78, MO79, MO82, MO86, MO89, MO90). Bei fünf SIV-infizierten Affen, die

kein AIDS entwickelten (da Cunha et al., 1995), lag eine geringe Virämie vor (MO75, MO80, MO85, MO92, MO93).

Die antiretrovirale Behandlung erfolgte mit BHS-gängigen Nukleosidanaloga. Vier SIV-infizierte Affen, die eine hohe Virämie aufwiesen, wurden mit 2´3´-Didesoxyinosin (ddl) und/oder 6-Cl-ddG subkutan behandelt. Drei von diesen vier Affen (MO76, MO77, MO91) erhielten zur Stabilisierung über einen Zeitraum von drei Wochen täglich 10 mg/kg ddl und danach für 6 Wochen täglich 75 mg/kg 6-Cl-ddG. Der vierte Affe (MO89), der auch eine hohe Viruslast aufwies, wurde 3 Wochen lang mit 200 mg/kg 6-Cl-ddG täglich behandelt (Depboylu et al., 2004). Die Zeitspanne zwischen Virusinokulation und Euthanasie betrug 4,5 bis 6,5 Monate.

### Charakterisierung und Gruppierung der Versuchstiere

Affennummer	SIV-Inokulation	AIDS	Behandlung
	Virus SIV <sub>8670</sub>	klinische Manifestation	6-Cl-ddG
<b>MO44</b>	Nein	Nein	Nein
<b>MO50</b>	Nein	Nein	Nein
<b>MO69</b>	Nein	Nein	Nein
<b>MO87</b>	Nein	Nein	Nein
<b>MO88</b>	Nein	Nein	Nein
<b>MO75</b>	Ja	Nein	Nein
<b>MO80</b>	Ja	Nein	Nein
<b>MO85</b>	Ja	Nein	Nein
<b>MO92</b>	Ja	Nein	Nein
<b>MO93</b>	Ja	Nein	Nein
<b>MO71</b>	Ja	Ja	Nein
<b>MO74</b>	Ja	Ja	Nein
<b>MO78</b>	Ja	Ja	Nein
<b>MO79</b>	Ja	Ja	Nein
<b>MO82</b>	Ja	Ja	Nein
<b>MO86</b>	Ja	Ja	Nein
<b>MO70</b>	Ja	Ja	Ja
<b>MO72</b>	Ja	Ja	Ja
<b>MO73</b>	Ja	Ja	Ja
<b>MO76</b>	Ja	Ja	Ja
<b>MO77</b>	Ja	Ja	Ja
<b>MO89</b>	Ja	Ja	Ja
<b>MO91</b>	Ja	Ja	Ja

## 3.3 Gewinnung des Probenmaterials

### 3.3.1 Präparation und Fixierung, ZNS Gewebegewinnung

Zur Narkose erhielten die Tiere Ketamin (20 mg/kg) und Ketaminazepromazin (10 mg/kg). Anschließend wurde eine transkardiale Perfusion mit 2,0 l PBS, 400 ml/kg 1% Formalin/PBS und 1,5 l/kg 4% Formalin/PBS durchgeführt. Gewebeproben zur

histologischen Aufarbeitung wurden direkt im Anschluss entnommen und nach standardisierten Protokollen nummeriert. Die Erstfixierung über Nacht wurde in 4% PFA/PBS vorgenommen (Depboylu et al., 2004). Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Gewebelöcke wurden in Bouin-Holland'scher Lösung für 48 Stunden nachfixiert. Über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen wurde die Fixans in täglich frischem 70%-igem Isopropanol ausgewaschen. Die anschließende Dehydratation in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration erlaubte die für das Schneiden der Gewebelöcke koordinierte Einbettung in Paraffin (Depboylu et al., 2004).

### **3.3.2 Vorbereitung der Objektträger**

Die Objektträger (OTs) wurden vor der histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung silanisiert, um eine gute Haftung der Hirngewebeschnitte zu gewährleisten. Nach Austestung von käuflich beschichteten und mit Poly L-Lysin behandelten OTs wurden für die Versuche TESAP-beschichtete OTs verwendet.

#### **Abfolge**

##### 1. Spülen der OTs:

Die OTs wurden in Kunststoffwannen mit 60°C heißem Wasser mit und ohne Spülmittel (in handelsüblicher Menge) gespült. Nun wurde mit demineralisiertem Wasser und dann mit Reinstwasser (Aqua bidest) nachgewaschen (je 10 min). Abschließend erfolgte eine Waschung mit 70%-igem Isopropanol auf einem automatischem Schüttler (45 min).

##### 2. Trocknen der OTs:

In einem Trockenschrank bei 60°C (2 h).

##### 3. Beschichtung:

Nun folgte die Beschichtung der OTs mit TESAP (3-Triethoxysilyl-propylamin). Dazu wurden die OTs in 2%-igem TESAP/Aceton (4 ml TESAP in 200 ml Aceton) und zweimal in Aceton (je 30 sec) gestellt. Dann wurden sie in Aqua bidest und demineralisiertem Wasser gewaschen (je 10 sec).

##### 4. Trocknen der OTs:

In einem Trockenschrank bei 45°C (über Nacht). Aufbewahrung der OTs bis zur Verwendung bei Raumtemperatur in OT-Kästen.

### **3.3.3 Schnitte von in Paraffin eingebetteten Geweben**

#### **Abfolge**

##### 1. Inbetriebnahme des Rotationsmikrotoms:

Nach einer Vorbehandlung in einem Wasserentgaser wird Aqua bidest im Mikrotom auf 42°C erwärmt.

##### 2. Schneiden der Gewebeblöcke:

Der Paraffinblock wird mit Festlegung der Schnittebene am Mikrotom adjustiert. Folgeschnitte von 7 µm Dicke werden angefertigt und auf dem erwärmten Wasserbad belassen, um Knicke und Blasen auf den OTs zu verhindern. Die Gewebeschnitte werden nun mit Hilfe eines feinen Pinsels auf die TESAP-beschichteten OTs gezogen und zum Trocknen auf einer 41°C warmen Heizplatte belassen.

##### 3. Trocknen der OTs:

Im Trockenschrank bei 60°C über Nacht. Lagerung der Schnitte bei Raumtemperatur in OT-Kästen.

### **3.3.4 Übersichtsfärbungen mit Giemsa**

Zur Bestimmung des gleichen Hirnabschnitts und für weitere histologische Untersuchungen wurde nach jedem 10. bis 15. Schnitt ein OT mit einem Hirnschnitt belegt, der nach Giemsa gefärbt wurde.

#### **Abfolge**

##### 1. Entparaffinierung und Hydratation:

Paraffinschnitte in Xylol (2x 5 min) und in Alkoholreihe absteigender Konzentration (100%, 96%, 90%, 80%, 70% je 5 min) und Aqua dest (5 min) belassen.

##### 2. Färbung:

Gewebeschnitte in frisch zubereiteter Giemsa-Lösung belassen (1 h). Nun folgt die Differenzierung der Rottöne in CH<sub>3</sub>COOH-Wasser und die Differenzierung der Blautöne in 96%igem Alkohol.

##### 3. Konservierung:

Gefärbte Gewebeschnitte in absolutem Alkohol (3x 5 min) und Xylol (3x 5 min) belassen. Abschließend mit DePex eindeckeln der OTs.

### 3.4 Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistologie stellt eine zentrale Methode der histopathologischen Diagnostik und Forschung dar. Die Techniken erlauben den morphologischen Nachweis von antigenen Komponenten (Proteinen, Polysacchariden und anderen Strukturen) in Zellen und Gewebeschnitten. In Paraffin eingebettetem Gewebematerial wurden Antigene (Epitope) mit etablierten und geeigneten Antikörpern mittels einfacher enzymatischer Immunhistochemie (IHC) und doppelmarkierter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

#### 3.4.1 Antikörper und Detektionssysteme

Die unterschiedlichen, an der Synthese und der vesikulären Speicherung von Neurotransmittern beteiligte, Zellstrukturen im ventralen Striatum wurden mit etablierten spezifischen Antikörpern detektiert. Diese Antigene waren TH, VMAT-2 und AADC für das DAerge/monoaminerge, ChAT und VACHT für das cholinerge, VGLUT-1 für das glutamaterge und VGAT für das GABAerge System. Für den Nachweis des Entzündungsgeschehens während einer SIV-Infektion wurden gliales fibrilläres Säureprotein (GFAP) für Astrozyten (Weihe et al., 1993) und ionisiertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsadaptermolekül-1 (Iba-1) für Mikroglia, Makrophagen und einwandernde Monozyten (Imai et al., 1998) verwendet. Der Virusnachweis erfolgte mit dem SIV Glykoprotein 41 (*gp41*). Die Erstellung von Titrationsreihen war für das Ermitteln der optimalen Arbeitskonzentration hilfreich. Durch die Verwendung biotinylierter Sekundärantikörper konnten die im Gewebe gebundenen Primärantikörper mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelten Avidin-Biotin-Peroxidasen und DAB (brauner Niederschlag, Peroxydase-Substrat) und eventuelle Zugabe von Nickel (blau-schwarzer Niederschlag, Komplexbildner) farblich dargestellt werden. Die Fluoreszenzdarstellung erfolgte entweder mit direkt an den Sekundärantikörper bindenden oder indirekt an Streptavidin gekoppelten Fluorochrome A647 (rote Fluoreszenz) oder A488 (grüne Fluoreszenz).

## Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Donorspezies	Quelle	Katalognr.	Verdünnung
AADC	aromatische Aminosäure-Decarboxylase	Kanninchen, p	Chemicon, Millipore, TemelUCA, USA	AB 136	1:200/ 1:100(F)/ 1:1000(F+T)
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase (Marker für cholinerge Neurone und Fasern)	Ziege, p	Chemicon	AB 144P	1:250
GFAP	saures Gliafaserprotein (Astrozytenmarker)	Meerschweinchen, p	PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg	GP 52	1:3000/ 1:100(F)
Iba-1	ionisierendes Calcium-bindendes Adaptermolekül-1 (Marker für mononukleäre Zellen)	Kaninchen, m	Wako Pure Chemical Ind., Osaka, Japan	019-19741	1:1000
TH	Tyrosinhydroxylase	Schaf, p	Chemicon	AB 142	1:1000/ 1:100(F)/ 1:3000(F+T)
SIV <sub>mac251</sub> , gp41	transmembranes Glykoprotein 41 (Marker für SIV)	Maus, m	AIDS Reagent Program, NIH, Bethesda, MD USA	KK41	1:200
VACht	vesikulärer ACh-Transporter (Marker für cholinerge Neurone und Fasern)	Hase, p	LE Eiden, NIH	80153	1:2000
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter (Marker für GABAerge Fasern)	Hase, m	Chemicon	AB-5855	1:1000
VGLUT-1	vesikulärer Glutamat-Transporter 1 (Marker für glutamaterge Fasern)	Meerschweinchen, p	Erickson, New Orleans, USA	BNIP 437/ P436/7/01	1:1000
VMAT-2	vesikulärer Monoamin-Transporter 2 (Marker für monoaminerge Neurone und Fasern)	Hase, p	LE Eiden	80182	1:2000/ 1: 100(F)/ 1:10000(F+T)

Abkürzungen: F: Immunofluoreszenz, F+T: Immunofluoreszenz mit Tyramidverstärkung, p: polyklonal, m: monoklonal.

## Sekundärantikörper und Detektionssysteme

Bezeichnung	Donorspezies	Quelle	Katalognr.	Verdünnung
Anti-Schaf-IgG-Biotin	Esel	Dianova, Hamburg	713-065-147	1:200
Anti-Hase-IgG-Biotin	Esel	Dianova	711-065-152	1:200
Anti-Ziege-IgG-Biotin	Esel	Dianova	705-065-147	1:200
Anti-Meerschweinchen-IgG-Biotin	Esel	Dianova	706-065-195	1:200
Anti-Ratte-IgG-Biotin	Esel	Dianova	712-065-153	1:200
Anti-Maus-IgG-Biotin	Esel	Dianova	715-065-151	1:200
Anti-Schaf-IgG-A647	Esel	MoBiTec, Göttingen	A-21488	1:100
Anti-Hase-IgG-A647	Huhn	MoBiTec	A-21443	1:100
Anti-Ziege-IgG-A647	Ziege	MoBiTec	A-21450	1:100
Streptavidin-Alexa-A488		MoBiTec	A-11073	1:200
Avidin-Biotin-Peroxidase		BIOZOL, München		1:500

### 3.4.2 Einfache enzymatische Immunhistochemie (IHC)

Bei der indirekten IHC erfolgt der Nachweis von Antigenen im Gewebeschnitt mit einem konjugiertem Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil des gegen das gesuchte Antigen gerichteten Primärantikörpers bindet. Die Konjugation des Sekundärantikörpers mit Biotin erlaubt die farbliche Darstellung der gesuchten Antigene mit Hilfe von Chromogenen.

Hierbei ist die ABC-Methode (Avidin-Peroxidase-Komplex), ein Nachweisverfahren, das sich die hohe Affinität des aus Hühnereiweiß gewonnen Glykoproteins Avidin für Biotin zu Nutze macht, hilfreich. Die Fähigkeit des Avidins vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden (Bourne, 2000), führt zur Bindung des Avidin-Biotin-Peroxidasekomplexes an den Sekundärantikörper. Das an Biotin gebundene Enzym Peroxidase oxidiert Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu Wasser und Sauerstoffradikalen, die das anschließend hinzugegebene wasserlösliche Chromogen 3,3-Diaminobenzindintetrahydrochlorid-Nickel (DAB-Ni) zu einem unlöslichen Phenazinfarbmolekül oxidieren. Das schwarz/dunkelblaue DAB-Ni erlaubt die Verwendung von Xylol-haltigen Eindeckmitteln.



### **Arbeitslösungen:**

Phosphatpuffer (PBS, 50 mM): 6,55 g (9,5 mM)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 45 g NaCl und 36,05 g (40,5 mM)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 4,5 l Aqua bidest lösen. Mit 1 M NaOH den pH auf 7,45 einstellen und anschließend den Ansatz mit Aqua bidest auf 5 l auffüllen.

Triton X-100 (0,4%) : Mischen von 100 ml 10% PBS mit 900 ml Aqua bidest und mit 4 ml Triton X-100.

### **Ablauf der Immunhistologie nach der ABC-Methode:**

#### 1. Entparaffinierung:

Paraffinschnitte in Xylol (3x 10 min) und in 100% Isopropanol (10 min) belassen.

#### 2. Blockierung der endogenen Peroxidase:

Um unerwünschte Reaktionen des Chromogens mit der endogenen Peroxidase zu verhindern, die zu einer unspezifischen Anfärbung der Proben führen können.

Inkubation der Gewebsschnitte mit frischem Ansatz von 0,1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Methanol (30 min) bei Raumtemperatur.

#### 3. Rehydratation in Isopropanolreihe absteigender Konzentration:

100% Isopropanol (10 min), 96%/80%/70% Isopropanol (je 5 min) und anschließende Wässerung in Aqua bidest (2x 5 min).

#### 4. Antigendemaskierung:

Permeabilisierung des fixierten Gewebes durch Inkubation mit 0,4%igem Triton X100 in 5% BSA/50 mM PBS (30 min) und 1%igem BSA/50 mM PBS (15 min) bei Raumtemperatur.

#### 5. Blocken unspezifischer Bindung:

Blockierung gewebsendogener, unspezifischer Avidine und Biotine durch Inkubation der Gewebeschnitte mit 30%igem Avidin/1%igem BSA/50 mM PBS (15 min) und 30%igem Biotin/1%igem BSA/50 mM PBS (15 min) bei Raumtemperatur. Belassen in 1%iger BSA/50 mM PBS-Lösung bis zum nächsten Arbeitsschritt.

#### 6. Inkubation Primärantikörper:

Auftropfen des Primärantikörpers in der Arbeitsverdünnung und Inkubation in feuchter Kammer bei 16°C (8 h) und anschliessend bei 37°C (2 h).

#### 7. Waschen:

In Aqua bidest (3x 5 min) und 50mM PBS (10 min). Belassen in 0,5%iger BSA/50 mM PBS-Lösung bis zum nächsten Arbeitsschritt.

#### 8. Inkubation Sekundärantikörper:

Inkubation des jeweils spezifischen biotinylierten Sekundärantikörpers in der Arbeitsverdünnung 1:200 in feuchter Kammer bei 37°C (45 min).

#### 9. Waschen:

In Aqua bidest (3x 5 min) und 50 mM PBS (10 min). Belassen in 0,5%iger BSA/50 mM PBS-Lösung bis zum nächsten Arbeitsschritt.

#### 10. Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex:

Auftropfen der bei Raumtemperatur zuvor (30 min) angesetzten ABC-Lösung (Ansatz: Pro ml 1%iger BSA/50 mM PBS je 20 µl Lsg. A und Lsg. B). Inkubation in feuchter Kammer bei 37°C (30 min).

#### 11. Waschen:

In Aqua bidest (3x 5 min) und 50mM PBS (10 min). Belassen in 0,5%iger BSA/50 mM PBS-Lösung bis zum nächsten Arbeitsschritt.

#### 12. Entwicklung mittels Chromogen:

In DAB-Nickel-Lösung (Ansatz: 16 ml DAB-Aliquot (100 mg) mit 8 ml Nickel-Aliquot (600 mg) in 800 ml 50 mM PBS lösen und filtrieren) die Gewebeschnitte unter starkem Rühren vorinkubieren (5 min) und anschließend unter Zugabe von 112 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Farbreaktion starten (8 min). Die Reaktion wird durch die Überführung der Gewebeschnitte in Aqua bidest gestoppt. Die Färbelösung wird durch die Zugabe von einigen Tropfen Natriumhypochlorid neutralisiert.

#### 13. Waschen:

In Aqua bidest (3x 5 min).

#### 14. Dehydratation:

In Alkoholreihe aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 96%, 100% je 10 min) und Xylol (3x 10 min). Abschließendes Eindeckeln mit DePex und Deckgläschen.

### **3.4.3 Immunhistochemische Doppelfluoreszenzmarkierung**

Die Doppelfluoreszenzmarkierung wurde durchgeführt, um eine genauere Phänotypisierung der auf den untersuchten striatalen Schnitten befindlichen Neurone

und Fasern vorzunehmen. Dabei können evtl. Koexistenzen durch die Verwendung von Primärantikörpern verschiedener Spezies nachgewiesen werden.

### **Arbeitslösungen**

Phosphatpuffer (50mM PBS): s. 3.2.6

TN-Puffer (1 l): 30 ml NaCl (150 mM) mit 50 ml Tris/HCL (100 mM) in 920 ml Aqua bidest mischen.

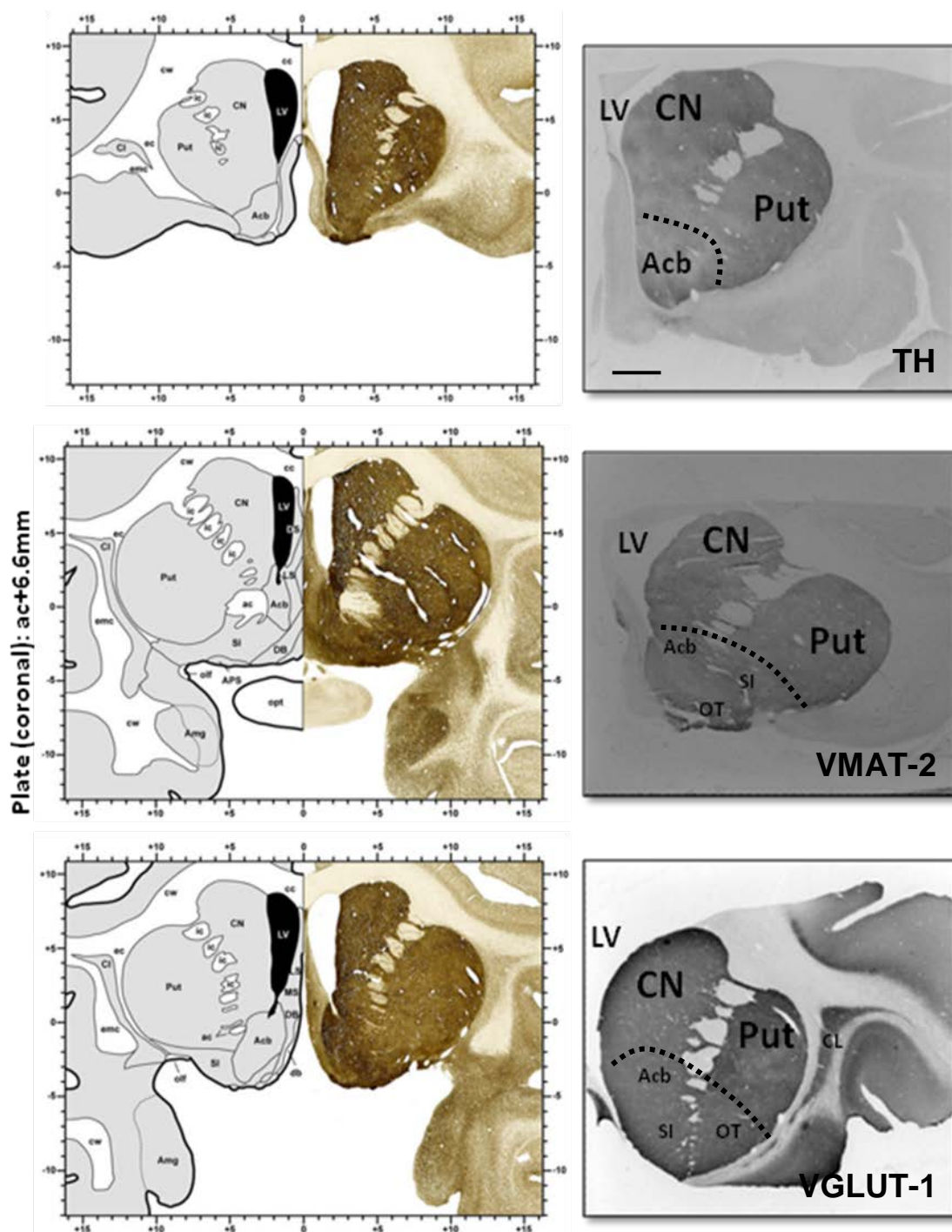
### **Ablauf**

Vorgehen wie Protokoll unter 3.2.6 mit Auslassung der Antigendemaskierung mit 0,4%igem Triton X-100 und Detektion des zweiten Primärantikörpers mit anderem Fluorochrom.

### **Doppelfluoreszenz mit Tyramidsignalverstärkung (CSA)**

Basierend auf der ABC-Methode beinhaltet die CSA-Methode („catalysed-signal-amplification“) die Zwischenschaltung einer speziellen Amplifikationsreagenz nach der Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Diese Reagenz beinhaltet biotyniliertes Tyramid, das durch die gebundene Peroxidase in eine reaktive Form überführt wird (Biotin-Präzipitation). Im folgenden Schritt vermittelt das abgelagerte Biotin die Bindung von Peroxidase-markiertem Streptavidin. Die CSA-Methode hat eine höhere Sensitivität als die herkömmliche ABC-Methode, da sie dazu führt, dass zusätzliche Enzymmoleküle abgelagert werden.

### 3.4.4 Coronare Schnittebenen



**Abb. 3.1: Zurordnung der coronaren Schnitte des Striatums.**

Darstellung des Striatums am Beispiel TH-, VMAT-2- und VGLUT-1-immungefärbter Schnitte. Die Grundlage für die Lokalisation der Striatumregionen bildete der Basalganglienatlas von Vasquez und Lanciego: The basal ganglia and thalamus of the long-tailed macaque in stereotaxic coordinates. A template atlas based on coronal, sagittal and horizontal brain sections-ENKEPHALIN. Jose´ L. Lanciego, Alfonso Vasquez, 2012. Marke: 50 µm.

Abkürzungen: CN: Nucleus caudatus, Put: Putamen, Acb: Nucleus accumbens, SI: Substantia innominata, OT: Tuberculus olfactorius, CL: Claustrum, LV: Seitenventrikel.

### 3.5 Auswertungen und statistische Analysen

Die Quantifizierung immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitte erfolgte unter dem Hellfeldmikroskop (AX 70 von Olympus) und für die Übersichtsaufnahmen (Abb. 3.1) unter der Fotoleuchttischkamera (NothornLight, Micro-Nikon). Die Bilder wurden mit einer digitalen Kamera (Spot RT Slider) erfasst, mit einem computergestützten Programm (SPOT Elite 3.5.7.1) aufgenommen und für die Quantifizierung an das ImageJ (1.44) und das MCID M4 Image Analysing System Programm übertragen. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte unter dem Olympus Fluoview Konfokalen Laserscanningmikroskop BX 50 WI, wobei mehrere Schnitte von verschiedenen Affen in der gleichen Ebene auf das Vorhandensein von Koexistenzen für die Phänotypisierung analysiert wurden.

Die Qualität des Untersuchungsgewebes und der Reaktion wurde von einem erfahrenen und gebildeten Untersucher kontrolliert und Ausweichendes aussortiert, um die Vergleichbarkeit der Inkubationsergebnisse zu gewährleisten. Voraussetzung hierfür war die konstante Behandlung des Untersuchungsgewebes und der Inkubationsschnitte.

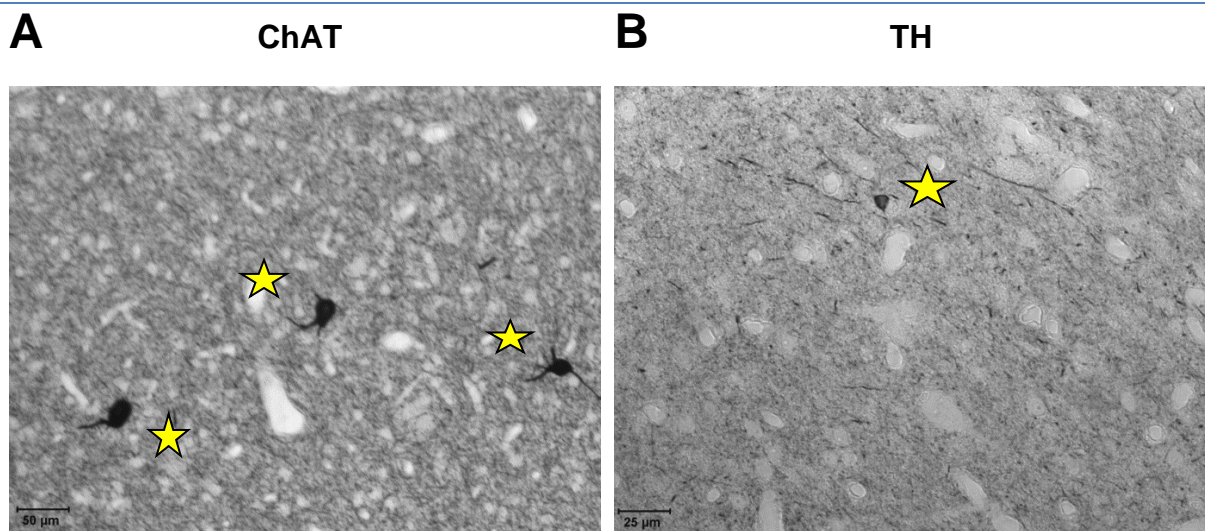
#### 3.5.1 Bestimmung der optischen Dichte der TH+, ChAT+, VACHT+, VGLUT-1+, VGAT+ und VMAT-2+ Nervenfasern

Die Bestimmung der optischen Dichte zur Quantifizierung der Faserinnervation erfolgte durch die Antikörperdetektionssysteme der entsprechend immunhistochemisch gefärbten Striatumschnitte. Die inkubierten Gewebeschnitte wurden auf einem Leuchttisch in 40-facher Vergrößerung abfotografiert. Die Bildanalyse erfolgte mittels ImageJ. Es wurde die striatale Fläche eines jeden Schnittes markiert. Die gemessenen Werte entsprechend der Dichte der Fasern, deren immunreaktive Fläche in Pixel angegeben wurde, bildeten die Grundlage für die statistische Analyse. Die Quantifizierung erfolgte, indem die optische Dichte des Hintergrunds von dem der bei inkubierten Gewebeschnitten gemessenen optischen Faserdichte subtrahiert wurde. Dies wurde für die jeweiligen Antikörper bei vier Affen mit jeweils fünf bis acht Gewebeschnitten pro Tier und Gruppe der untersuchten Studienkohorte durchgeführt. Pro Affe und Gruppe wurde ein Mittelwert der optischen Dichte berechnet. Die Bestimmung der Mittelwerte pro Tier erlaubte die statistische Auswertung mit dem Programm Graph Pad Prism 4 mittels Kruskal-Wallis und dem pairwise t-Test nach Bonferroni-Hohn. Werte für  $p < 0,001$  (\*\*) und  $p < 0,01$  (\*) wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Qualifizierung und Quantifizierung der Faserdichte wurde durchgeführt, nachdem die Objektträger mit einem Code versehen wurden. Dies erlaubte eine einfache Verblindung der Untersucher. Eine Überprüfung der Richtigkeit

der durchgeführten Berechnungen wurde freundlicher Weise vom Institut für Biometrie und Epidemiologie an der Phillips-Universität Marburg durchgeführt.

### 3.5.2 Quantifizierungen der TH+, ChAT+ und VACHT+ Neurone

Um eine Unterscheidung zwischen einer möglicherweise durch SIV-induzierten synaptischen Schädigung von einem neuronalem Zellverlust treffen zu können, wurden zusätzlich pro Gruppe bei vier Affen in fünf bis acht Serienschnitten des Striatums TH-, ChAT- und VACHT-immungefärbte Neurone gezählt. Pro Schnitt wurden acht zufällig ausgesuchte Areale des ventralen Striatums am Hellfeldmikroskop (400-fache Vergrößerung) nach Neuronen mit klarem Nukleus untersucht und ausgezählt. Die Verblindung des Untersuchers, statistische Auswertung und die Überprüfung fand wie in 3.5.1 angegeben statt.



**Abb. 3.2: Beispielaufnahmen in 40-facher Vergrößerung.**

Mittels des Cell Counter Plug Ins der Bildanalysesoftware ImageJ wurden Neurone (hier mit einem gelben Stern versehen) untersucht. Pro inkubiertem Gewebeschnitt wurden in acht randomisiert ausgewählten Gesichtsfeldarealen Neurone ausgezählt. **A:** MO93, SIV/-AIDS; **B:** MO50, Ctrl.

### 3.5.3 Darstellung der Immunreaktivität der Neuroinflammation

Für die Darstellung der SIV-Infektion und der daraus resultierenden inflammatorischen und glialen Reaktion wurden SIV *gp41* sowie Iba-1 und GFAP verwendet. Sie diente dem alleinigen Zweck der Visualisierung des Entzündungsgeschehens. Dafür wurden je vier Gewebeschnitte aus den vier Gruppen der Studienkohorte mittels einfacher DAB-Ni-IHC inkubiert, die anschließend mittels MCID-Programm in 20-facher Vergrößerung fotografiert wurden.

#### 3.5.3.1 Auswertung der Iba-1+ mikroglialen Entzündungsreaktion

Das Iba-1 ist ein Calcium-Bindeprotein, das spezifisch in Zellen monozytären Ursprungs wie Mikroglia und Makrophagen exprimiert wird und an der Aktivierung ruhender Mikroglia beteiligt ist. Es wird als anerkannter Mikroglia/Makrophagen-Marker verwendet. Mikroglia-Zellen sind als Immunzellen des ZNS an neurodegenerativen und inflammatorischen Prozessen, die durch eine lentivirale Infektion ausgelöst werden, maßgeblich beteiligt. Zur qualitativen und quantitativen Auswertung wurde die Anzahl und die Morphologie der Iba-1-immunpositiven Zellen analysiert (Abb. 3.3). Für jedes Versuchstier wurden Scoring-Werte ermittelt, die statistisch und grafisch ausgewertet wurden (One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's Post-Test für multiples Vergleichen mit dem Programm GraphPad Prism 4.0).

#### Scoring-System für Iba-1

Zellform:	ruhend	amöboid-fokal	amöboid-diffus	Gesamtscore
Score	0	1	2	0 - 6
Multinukleäre Riesenzellen:	keine	< 5 / cm <sup>2</sup>	> 5 / cm	
Score	0	1	2	
Mikrogliaknötchen:	keine	< 3 / cm <sup>2</sup>	> 3 / cm <sup>2</sup>	
Score	0	1	0	

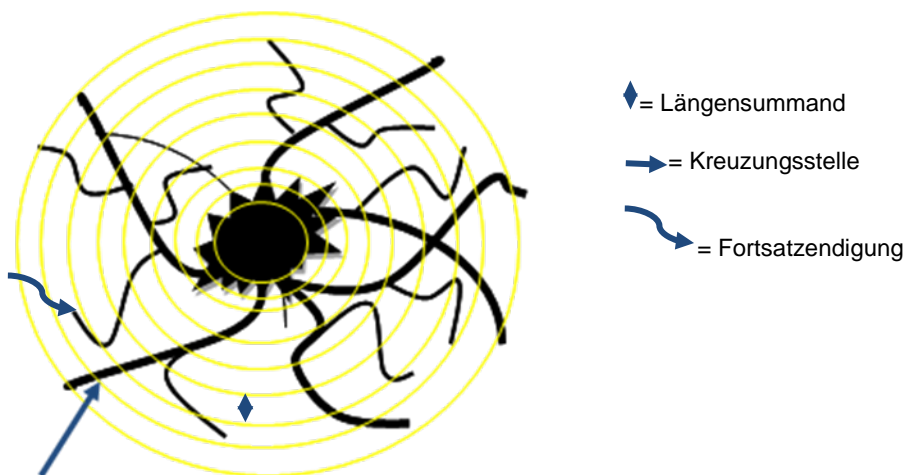
**Abb. 3.3: Bewertung der Iba-1-Expression.**

Das Scoring-System erlaubt eine qualitative und quantitative Bewertung der Iba-1 Expression. Es wurden Punktwerte von 0-2 für die Kriterien Zellform, Anzahl der multinukleären Riesenzellen und Mikrogliaknötchen vergeben. Höhere Punktwerte stehen für eine ausgeprägtere Aktivierung der mikroglialen Entzündungsreaktion. Die Analyse erfolgte jeweils an vier Versuchstieren pro Versuchsgruppe. Dabei erfolgte die Bewertung eines jeden Kriteriums mit jeweils genau einem Punktwert. Anschließend wurde aus den einzelnen Punktwerten die Summe – der Gesamtscore – gebildet. Hierbei können Werte zwischen 0 (keine Aktivierung der Mikroglia) und 6 (ausgeprägte Aktivierung der Mikroglia) erreicht werden.



### 3.5.3.2 Auswertung der GFAP+ astroglialen Entzündungsreaktionen

Das GFAP ist als Intermediärfilament im Zytoskelett von Astroglia lokalisiert und gilt als klassischer Marker für diese im ZNS. Bei Infektionen und neurodegenerativen Erkrankungen kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von Astrozyten (Astrogliose). In der Folge der Aktivierung hypertrophieren die Astrozyten mit konsekutiver Steigerung ihrer GFAP-Expression. Für die Quantifizierung einer durch eine SIV-Infektion bedingten Gliose wurde das Scholl-Schema (Scholl, 1953) angewandt. Hierbei wurde eine Serie konzentrischer Ringe mit einem Abstand von 10  $\mu\text{m}$  um einen Mittelpunkt im Soma der Astrozyten gelegt (Abb. 3.4). Folgende Kriterien für die Analyse mussten für die ausgewählten Astrozyten erfüllt sein: eindeutige Lokalisation, Soma und Fortsätze vollständig mit DAB-Ni imprägniert und einfache Differenzierbarkeit von benachbarten Astrozyten. Die Quantifizierung der Astrozytenfortsätze erfolgte nach folgendem Schema. Die Länge der Fortsätze zwischen zwei Ringen, die Anzahl der Fortsatzenden und die Anzahl der Kreuzungspunkte mit jedem Ring wurden addiert. Die Auswertung erfolgte mittels dem ImageJ-Plug In: Sholl Analysis. Die Bestimmung der Mittelwerte pro Tier erlaubte die statistische Auswertung mit dem Programm Graph Pad Prism 4 mittels One Way ANOVA und dem pairwise t-Test nach Bonferroni-Hohn.



**Abb. 3.4: Grundprinzip der Scholl-Analyse.**

Das Schema veranschaulicht das Messverfahren zur Quantifizierung der Astrozytenaktivität. Eine Reihe konzentrischer Ringe wird mit einem Abstand von je 10  $\mu\text{m}$  um den Mittelpunkt des Somas gelegt. Innerhalb eines Ringes werden folgende Parameter errechnet: Kreuzungspunkt eines Astrozytenfortsatzes mit Ring, Endigungen der Fortsätze und die Summe aller Fortsatzlängen. Die einzelnen Parameter werden pro untersuchtem Astrozyten summiert. Die Analyse erfolgte computerunterstützt mithilfe des Plug Ins Sholl-Analysis des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ.



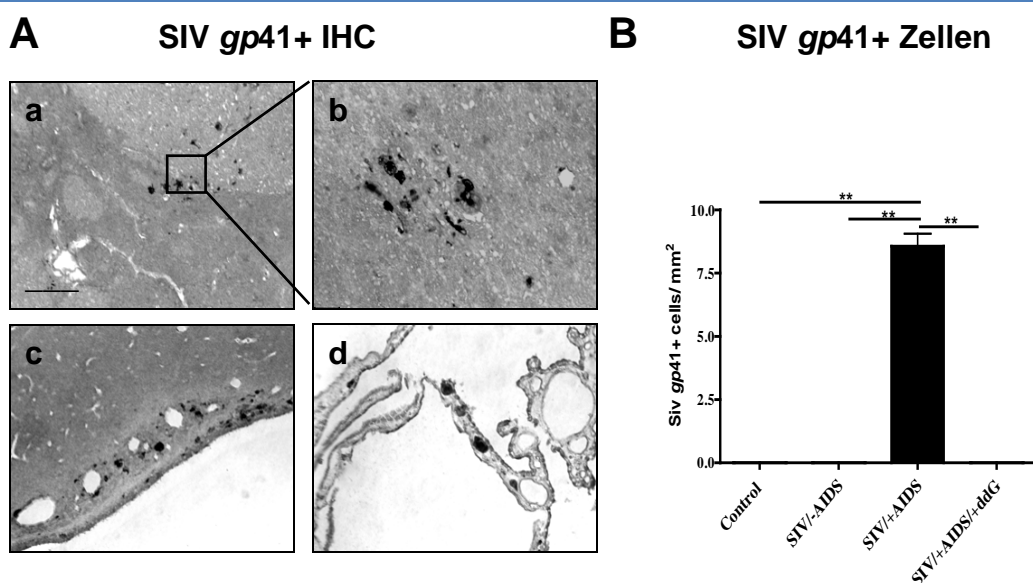
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Darstellung der lentiviralen Entzündungsreaktion

Der Beweis für die stattgefundene lentivirale Infektion und die darausfolgenden Entzündungsreaktionen im Striatum wurde für die Untermauerung der nachfolgend aufgeführten Ergebnisse ausgeführt. Zusätzlich konnte damit der Effekt einer antiretroviralen Behandlung auf die zellulären Entzündungsreaktionen und auf die Viruslast im untersuchten Gewebe dargestellt werden.

#### 4.1.1 Der Einfluss einer lentiviralen Infektion und deren antiretrovirale Behandlung auf die striatale Viruslast

Für die Darstellung des verwendeten Modells wurde die Viruslast die untersuchten striatalen Gewebeschnitte quantifiziert. Hier zeigte sich, dass das SIV nur in der an AIDS erkrankten Gruppe ( $8,56 \pm 2,5 / \text{mm}^2$ ) zu detektieren war (s. Abb. 4.7A). Die virustragenden Zellen ließen sich besonders fokal an Gefäßen, subventrikulär, meningeal, im Plexus choroideus und in der Capsula interna nachweisen (s. Abb. 4.7B). Zellen monozytären Ursprungs wie Mikroglia, Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen waren SIV *gp41*+. Neurone, Endothelzellen und Makroglia konnten als virustragende Zellen ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.1: Graphische Darstellung der Quantifizierung SIV *gp41*+ Zellen im Striatum.**

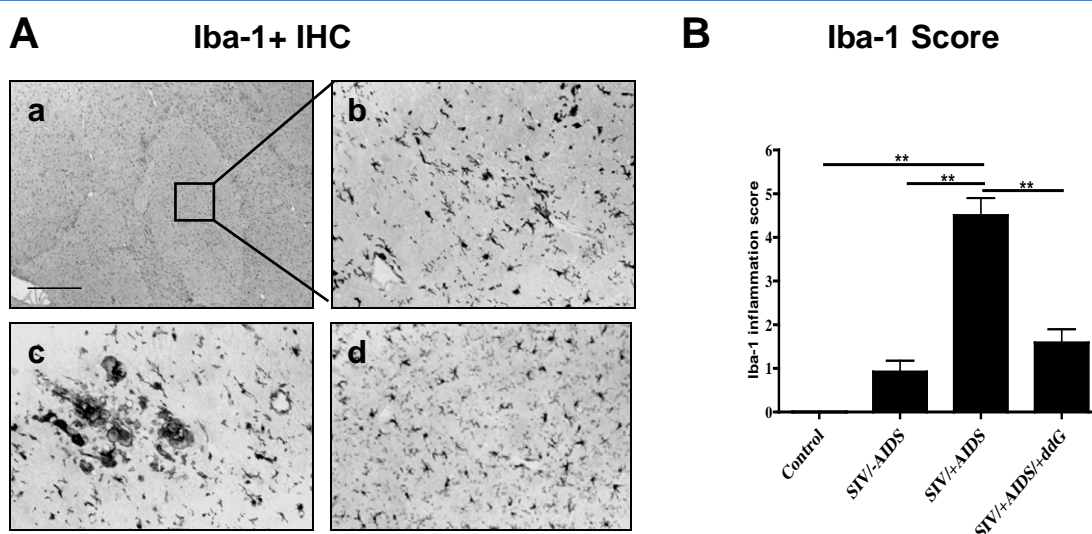
**A:** Repräsentative Beispielbilder: a: SIV *gp41*+ Zellen in der Capsula interna. b: Bei Vergrößerung werden die Mikrogliaknötchen sichtbar (MO89, SIV/+AIDS). c: Darstellung virustragender subventrikulärer Zellen. d: Virustragende Zellen im Plexus choroideus (MO71, SIV/+AIDS). Marke: 50  $\mu\text{m}$  in a, c und d; 25  $\mu\text{m}$  in b.

**B:** SIV-infizierte Zellen zeigen sich nur im Gewebe der an AIDS erkrankten Affen. Die antiretrovirale Behandlung führt zu einer vollständigen Rückbildung der viralen Last. Fehlerbalkendarstellung: SEM, \*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.1.2 Iba-1 als Marker für immunaktive Zellen

Das Protein Iba-1 wird spezifisch in Makrophagen und Mikroglia, die als inflammatorische Reaktion auf Neurodegeneration vermehrt gebildet werden, exprimiert. Um die Intensität der Mikrogliaaktivierung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen vergleichen zu können, wurden die einzelnen Mikroglia/Makrophagen gezählt und ihre Morphologie ausgewertet (s. Kap. 3.5.3). In der an AIDS erkrankten Gruppe war eine signifikante Steigerung der mikroglialen und monozytären Iba-1-Expression ( $4,50 \pm 1,38$ ) gegenüber der Kontrollgruppe ( $0 \pm 0$ ) und der nicht an AIDS erkrankten Gruppe zu verzeichnen (s. Abb. 4.8A). Die Aktivierung mikroglialer Zellen, die von einer ruhenden zu einer amöboiden Morphologie wechseln, war in den untersuchten striatalen Geweben diffus zu verzeichnen. Multinukleäre Iba-1+ Riesenzellen und Mikrogliaknötchen konnten vor allem in der weißen Substanz beobachtet werden.

In der antiretroviral mit 6-Cl-ddG behandelten Gruppe kam es zu einer starken Reduktion der mikroglialen inflammatorischen Prozesse ( $1,58 \pm 1,1$ ), die jedoch noch im Vergleich zu der nicht an AIDS erkrankten Gruppe ( $1 \pm 0,9$ ) in einem höheren Grad persistierten.



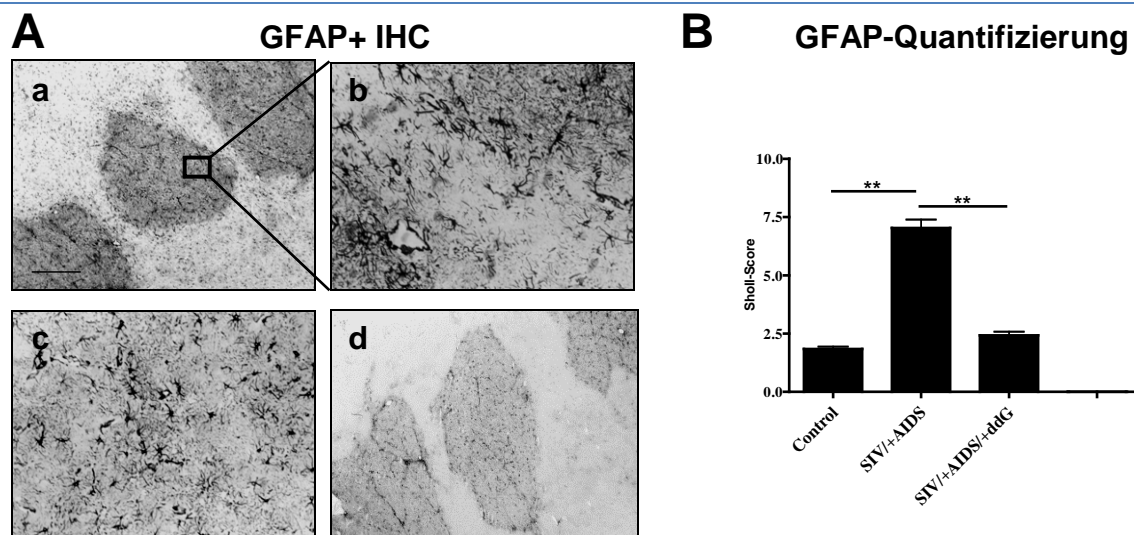
**Abb. 4.2: Mikrogliale Inflamationsreaktion dargestellt durch die Iba-1-Aktivität im Striatum.**

**A:** Repräsentative Beispielbilder: a: 20x Vergrößerung der Immunreaktivität für Iba-1. b und c: Bei Vergrößerung eines Areals aus der Capsula interna ist die Mikrogliareaktion erkennbar (MO89, SIV/+AIDS). d: Aufnahme von Iba-1+ Mikrogliaknötchen in der Capsula interna (MO70, SIV/+AIDS). Marke: 50  $\mu$ m in a, b und d; 25  $\mu$ m in c.

**B:** Inflammationsscore: Signifikante Steigerung der Mikrogliaaktivierung im Gewebe symptomatischer Versuchstiere gegenüber der nicht-infizierten Kontroll- und asymptomatischen Versuchstiergruppe. Die 6-Cl-ddG-Behandlung führt zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliaaktivierung auf annähernd Niveau der asymptomatischen Versuchstiergruppe. Darstellung der Mittelwerte und SEM. \*\*  $p < 0,001$ . Der Inflammationsscore umfasst morphologische Aktivitätsmerkmale und Inzidenz von multinukleären Riesenzellen und Mikrogliaknötchen, nähere Erläuterungen s. Kapitel 3.5.3.

#### 4.1.3 GFAP als Marker für Astrozyten und Astrogliose

GFAP wird in Astrozyten exprimiert und ist primär in deren sternförmigen Fortsätzen nachweisbar. Als Folge von neurodegenerativen und entzündlichen Prozessen wird die GFAP-Expression gesteigert. Die Astrogliose ist neben einer GFAP-Überexpression zudem gleichzeitig gekennzeichnet durch eine hypertrophe Veränderung der Astrozyten und ihrer Fortsätze sowie durch eine Zunahme der Astrozytenzahl. In der vorliegenden Arbeit wurde die morphologische Veränderung der Astrozyten anhand der Sholl-Analyse objektiviert (s. Kapitel 3.5.3). Darin berücksichtigt wird die Summe der Länge aller Astrozytenfortsätze, der Verzweigungsgrad der Fortsätze und die Gesamtzahl aller Astrozytenfortsätze. Die Ergebnisse zeigen, dass es in der an AIDS erkrankten Gruppe ( $7,03 \pm 4,5$ ) zu einer starken Astrogliose kam. Die Behandlung mit 6-Cl-ddG erwies sich als effektiv ( $2,42 \pm 2,3$ ).



**Abb. 4.3: Astrozytäre Inflamationsreaktion dargestellt durch die GFAP-Quantifizierung im Striatum.**

**A:** Repräsentative Beispielbilder: a: Immunreaktivität für GFAP. b und c: Vergrößerung eines Areals aus der Capsula interna ist die Astrogliose deutlich erkennbar (MO71, SIV/+AIDS). d: Repräsentative Aufnahme einer GFAP-IHC in der Capsula interna von einem Kontrolltier (MO50, Control). Die GFAP-Färbung ist bei Fehlen einer Immunreaktion deutlich weniger ausgeprägt. Marke: 50  $\mu$ m in a und d; 25  $\mu$ m in b und c.

**B:** Graphische Darstellung der Astroglioseanalyse mittels Sholl-Score: Signifikante Steigerung der Astrogliaaktivierung im Gewebe symptomatischer Versuchstiere gegenüber der nicht-infizierten Kontroll- und asymptomatischen Versuchstiergruppe. Die 6-Cl-ddG-Behandlung führt zu einer signifikanten Reduktion der Astrogliaaktivierung etwa auf Niveau der asymptomatischen Versuchstiergruppe. Darstellung der Mittelwerte und SEM. \*\*  $p < 0,001$ .

## **4.2 Effekte einer lentiviralen Infektion und der antiretroviralen Behandlung auf das monoaminerge System im Striatum**

Um den Einfluss einer lentiviralen Infektion auf das monoaminerge System zu erfassen wurde eine IHC für TH sowie VMAT-2 von striatalen Gewebeschnitten durchgeführt. Um eine genauere Phänotypisierung zu den DOPAergen oder DAergen Strukturen treffen zu können, wurden Doppel-Immunofluoreszenzfärbungen durchgeführt und ausgewertet.

### **4.2.1 Irreversible VMAT-2-Reduktion bei teilweiser Erholung der TH-Faserdichte**

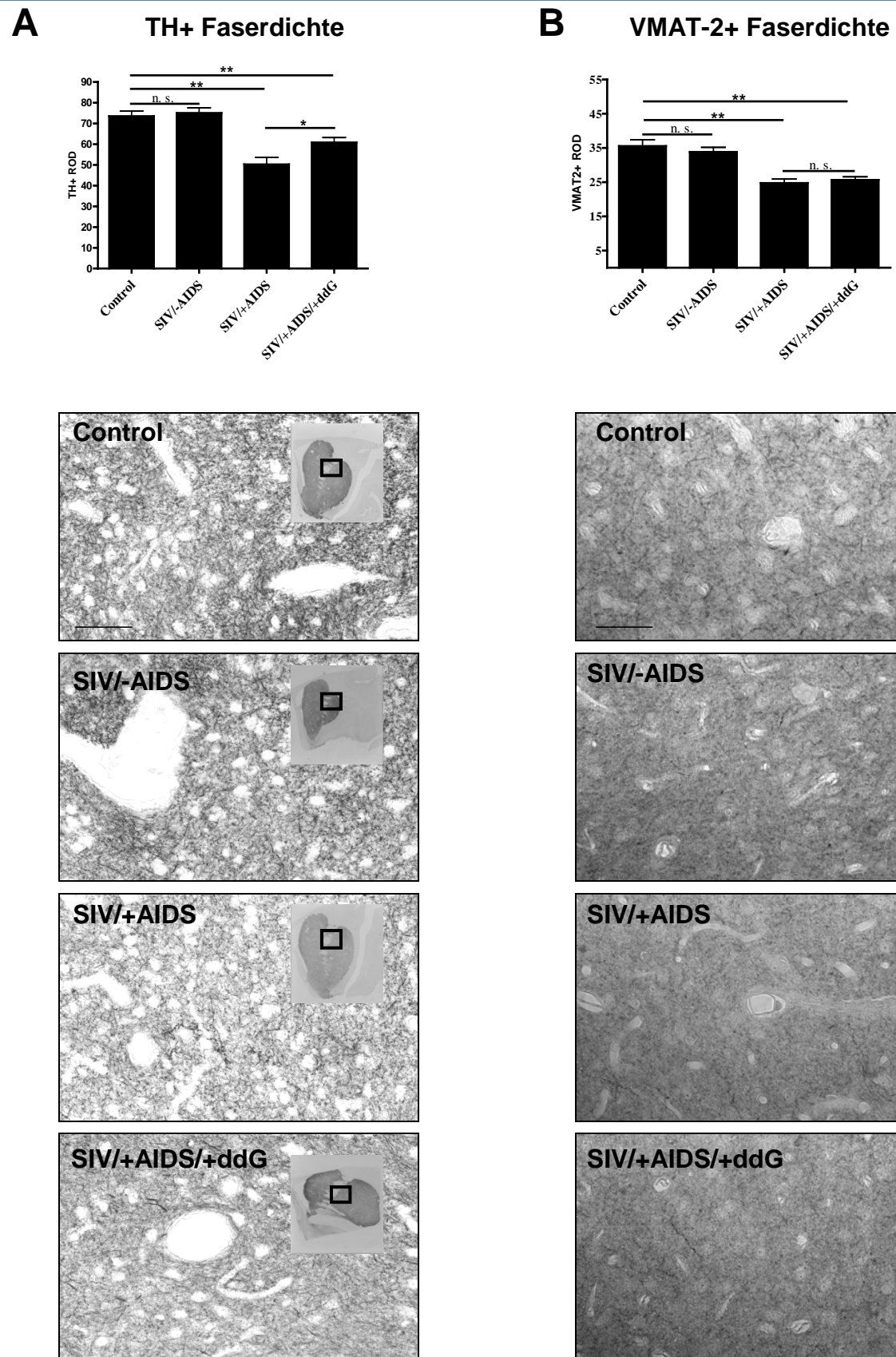
Die monoaminerge Innervation des Striatums wurde durch eine optische Dichtebestimmung von TH- und VMAT-2-immungefärbten Fasern bestimmt.

Bei der quantitativen Erfassung der TH+ Fasern zeigte sich eine signifikante Reduktion der relativen optischen Faserdichte (ROD) in der an AIDS erkrankten Gruppe (SIV/+AIDS) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Control) um fast 32% auf  $50,2 \pm 3,4$  ( $p < 0,001$ ) (s. Abb. 4.1A). Solche Veränderung konnten in der asymptomatischen Gruppe (SIV/-AIDS) nicht beobachtet werden ( $75,1 \pm 2,5$ ;  $p > 0,05$ ). Die antiretrovirale Behandlung konnte die Abnahme der TH+ Faserdichte zwar reduzieren ( $60,8 \pm 2,4$ ;  $p < 0,01$ ), aber nicht komplett wieder auf Kontrollniveau normalisieren.

Um das Ausmaß der durch lentivirale Infektion ausgelösten Schädigung des monoaminergen Systems abzuschätzen, wurde weiterhin die Anzahl der TH+ Neurone im Striatum bestimmt. Eine One Way ANOVA Varianzanalyse zeigte keine Unterschiede der striatalen TH+ Neuronenzahl in den untersuchten Gruppen (s. Abb. 4.1A). Weder in der SIV/-AIDS ( $7,48 \pm 1,1$  /mm<sup>2</sup>;  $p > 0,05$ ) noch in der SIV/+AIDS ( $7,72 \pm 1,5$  /mm<sup>2</sup>;  $p > 0,05$ ) Gruppe wurden Veränderungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei der TH+ Neuronenzahl festgestellt.

Dagegen war die optische Dichte von VMAT-2+ Fasern in den untersuchten striatalen Arealen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, um fast 35% auf  $23,7 \pm 4,3$  /mm<sup>2</sup> ( $p < 0,001$ ) bei der SIV/+AIDS Gruppe reduziert (s. Abb 4.1B). Die Dichte von VMAT-2+ Fasern in der SIV/-AIDS Gruppe ( $33,5 \pm 4,3$  /mm<sup>2</sup>;  $p > 0,05$ ) war nicht verändert im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die AIDS-bedingte Abnahme der VMAT-2+ Faserdichte im Striatum konnte durch die antiretrovirale Behandlung ( $25,1 \pm 3,2$  /mm<sup>2</sup>;  $p > 0,05$ ) nicht wieder das Normalniveau der Kontrollgruppe erreichen.





**Abb. 4.4: Effekte der lentiviralen Infektion auf die TH+ sowie VMAT-2+ Innervation des Striatum.**

**A:** TH+ Faserdichte im Striatum: Bestimmung mittels optischer Dichtemessung (ROD: relative optische Dichte) der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die ROD zeigt sich im

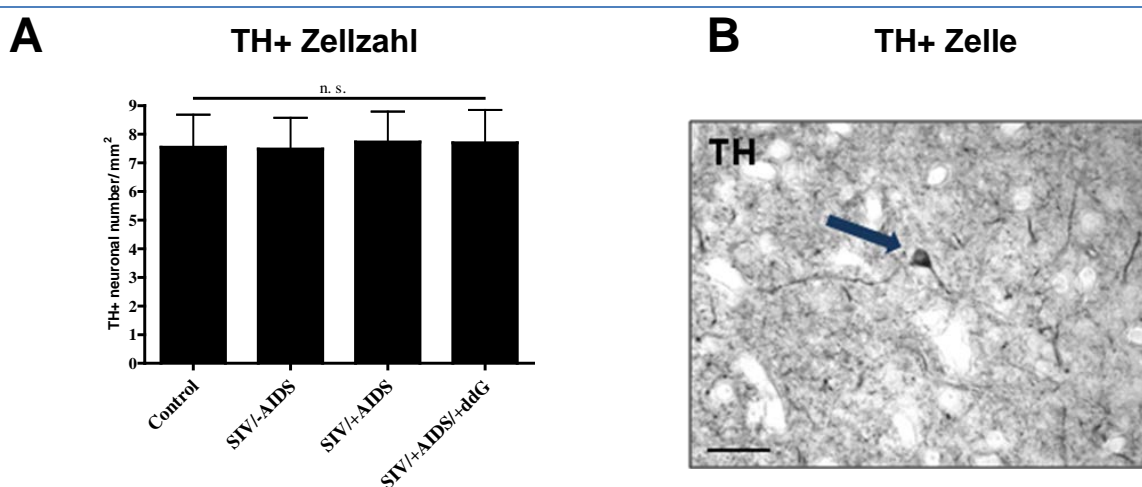
Striatum der an AIDS erkrankten Gruppe deutlich gemindert mit einer nicht vollständigen Erholung der Fasern durch die antiretrovirale Behandlung.

Die repräsentativen Aufnahmen stammen aus dem medialen Caudatus nahe der Capsula interna, siehe jeweilige Übersichtsaufnahmen (Control: MO69, SIV/-AIDS: MO92, SIV/+AIDS: MO86, SIV+AIDS/+ddG: MO76). Man erkennt einen ausgeprägten Faserverlust im Striatum der SIV/+AIDS im Vergleich zur Control. Marke: 25  $\mu$ m.

**B:** Graphische Darstellung der errechneten VMAT-2+ Faserdichte. Man erkennt bei der SIV/+AIDS -Gruppe eine signifikante Abnahme der VMAT-2+ Fasern im Vergleich zur Control Gruppe. Die antiretrovirale Behandlung führt nicht zu einer Reversibilität des Faserverlustes.

Die repräsentativen Bilder für die vier Versuchsgruppen sind aus dem medialen Caudatus, nahe der Capsula interna (Control: MO50, SIV/-AIDS: MO92, SIV/+AIDS: MO76, SIV/+AIDS/+ddG: MO91). Optisch erkennbar ist die Abnahme der Faserdichte in der SIV/+AIDS und der behandelten-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Marke: 25  $\mu$ m.

\*\* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,001$  und \* signifikanter Unterschied mit  $p < 0,01$ ; n. s., nicht signifikant  $p > 0,05$ ; Fehlerbalkendarstellung SEM, Kruskal Wallis One Way ANOVA, post hoc Bonferroni Holm Test.



**Abb. 4.5: Effekte der lentiviralen Infektion und der antiretroviralen Behandlung auf die TH+ Neuronenzahl im Striatum.**

**A:** Die Grafik illustriert die quantitative Bestimmung der TH+ Zellkörperzahl im Striatum. Es ergeben sich keine statistischen Unterschiede zwischen den analysierten Versuchskohorten.

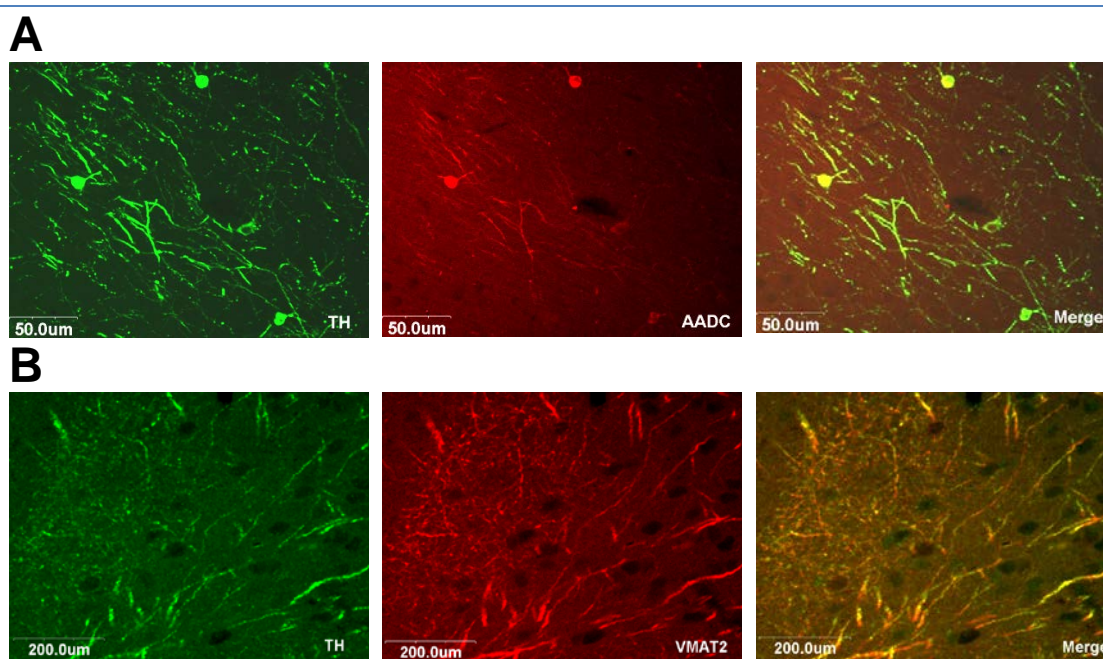
**B:** Repräsentatives Bild zur Darstellung TH+ Neurone im Striatum (blauer Pfeil) eines Tieres von der SIV/+AIDS Gruppe (MO70), Marke: 50  $\mu$ m.

n. s., nicht signifikant  $p > 0,05$ . Fehlerbalkendarstellung SEM, Kruskal Wallis One Way ANOVA, post hoc Bonferroni Holm Test.

#### 4.2.2 Phänotypisierung der TH+ Neurone

Die TH-IHC ermöglicht die Markierung catecholaminerger Neurone. Um die DOPAerge oder DAerge Dignität der untersuchten TH+ Neurone und Fasern im Striatum genauer darzustellen, wurde eine Doppel-Immunofluoreszenz für TH und AADC durchgeführt und mit konfokaler Laserscanningmikroskopie analysiert. Hierbei zeigte sich, dass der Grossteil (ca. 87%) der untersuchten TH+ Neurone eine Koexistenz mit AADC aufwiesen (s. Abb. 4.4A). Folgeschnittanalysen dieser TH+/AADC+ Neurone zeigten, dass sie keine Komarkierung mit VMAT-2 hatten. Diese Neurone werden daher als "nicht-exozytotische catecholaminerge Neurone" bezeichnet (Weihe et al., 2014).

Eine positive Immunreaktion wurde für VMAT-2 und TH lediglich in Nervenfasern beobachtet (s. Abb. 4.4B). Sie repräsentieren die monoaminergen Efferenzen in das Striatum.



**Abb. 4.6: Koexpression von TH und AADC in Neuronen und Fasern sowie von TH und VMAT-2 in Fasern im Striatum.**

**A:** Laserscanning Analyse zeigt, dass einige Neurone und Fasern sowohl TH (links, grün) als auch AADC (mitte, rot) exprimieren und nach Überlagerung der Fluoreszenzsignale dann gelb erscheinen (rechts). In den beiden oberen TH+ Neuronen ist AADC koexprimiert, nicht aber in dem rechts unteren TH+ Neuron. Die Bilder stammen aus dem medialen Striatum, nahe der Capsula interna (MO69, Control).

**B:** Aufnahmen aus dem Caudatus, nahe der Capsula interna, Kolokalisation von VMAT-2 mit TH in striatalen Nervenfasern und synaptischen Endigungen. Doppel-IF mit Tyramidverstärkung.

### **4.3 Effekte von lentiviraler Infektion und antiretroviraler Therapie auf das cholinerge System im Striatum**

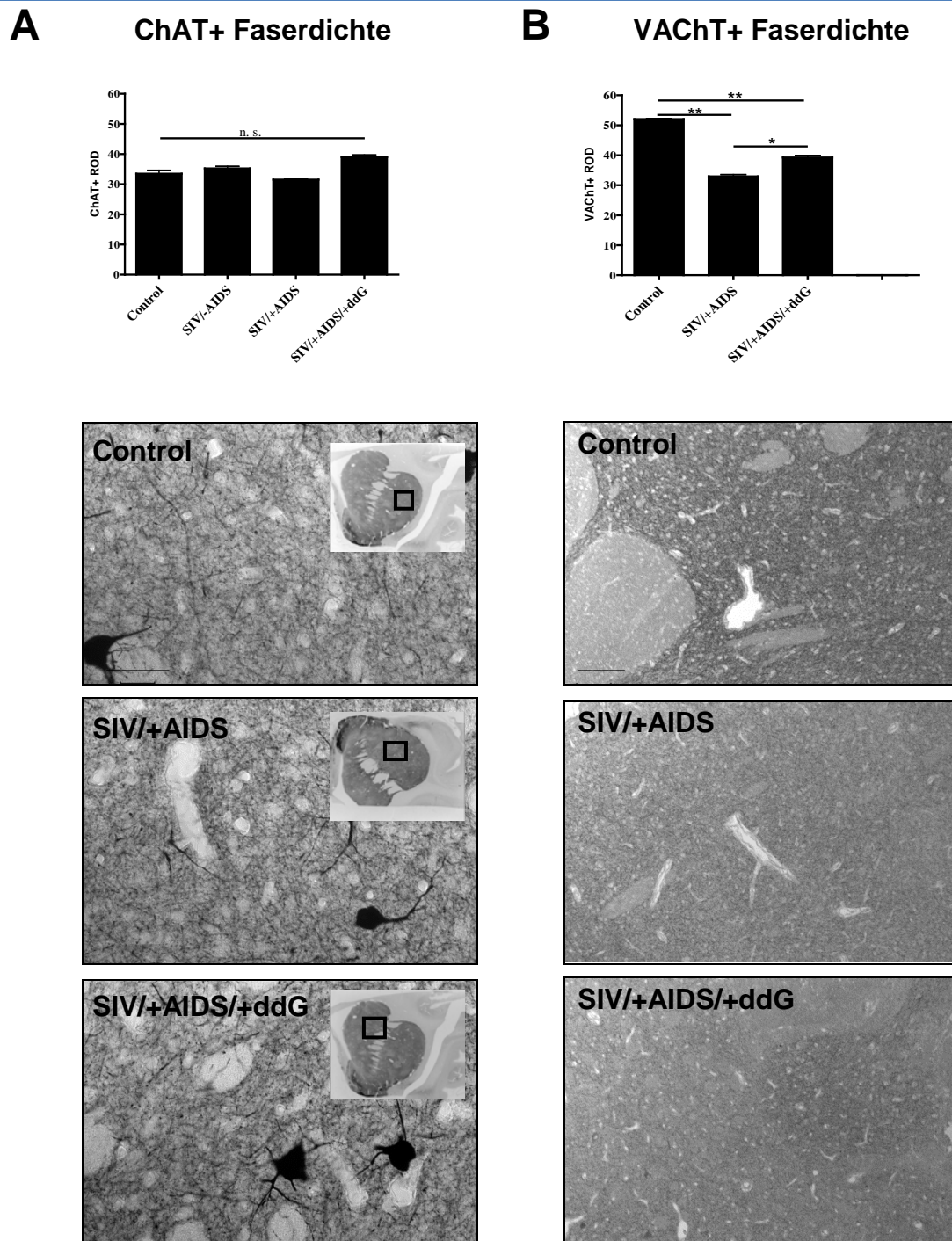
Um Aussagen über eine Beeinträchtigung der cholinergen Innervation im Striatum während der SIV-Infektion treffen zu können, wurde zum einen die optische Dichte von den ChAT+ und auch VACHT+ Fasern bestimmt, die Anzahl ChAT+ und VACHT+ striataler Neurone erfasst.

#### **4.3.1 Abnahme der VACHT+ Faserdichte bei unveränderter ChAT+ Faserdichte**

Interessanterweise hatten die durchgeführten ROD-Analysen der ChAT-Immunreaktivität keine Veränderung im Striatum der SIV/-AIDS und SIV/+AIDS Gruppen im Vergleich zu der Control Gruppe ergeben (s. Abb. 4.4A).

Die ROD von VACHT+ Fasern war in der frühen Phase der SIV-Infektion im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion der VACHT+ Faserdichte in der SIV/+AIDS Gruppe, die im Vergleich zu der Kontrollgruppe um fast 40% ( $p < 0,001$ ) sank. Die antiretrovirale Behandlung führte nur zu einer geringen Restitution der cholinergen VACHT+ Innervation ( $p < 0,05$ ).





**Abb. 4.7: Effekte der lentiviralen Infektion und deren antiretroviralen Behandlung auf die ChAT+ und VACHT+ Faserdichte im Striatum.**

**A:** ChAT+ Faserdichte im Striatum: Bestimmung mittels optischer Dichtemessung (ROD: relative optische Dichte) der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Quantifizierung der untersuchten Gewebestücke zeigte keine Unterschiede der ChAT+ Faserdichte.

Die Gruppen-repräsentativen Bilder stammen aus dem medialen Caudatus (Control: MO50, SIV/+AIDS: MO70, SIV/+AIDS/+ddG: MO89). Marke: 25  $\mu$ m.

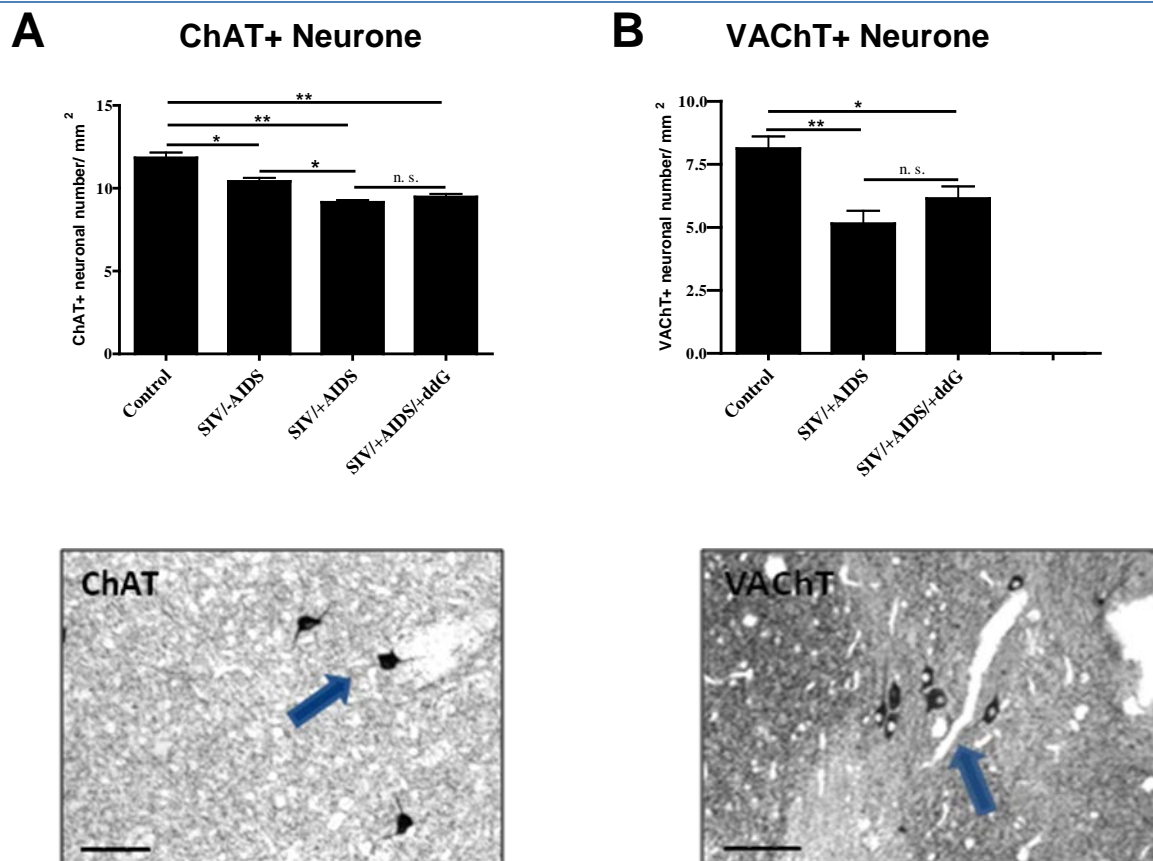
**B:** Die Grafik illustriert die optische Dichte der VACHT+ Innervation im Striatum. Man erkennt bei der SIV/+AIDS Gruppe eine signifikante Abnahme der VACHT+ Faserdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die antiretrovirale Behandlung führt zu einer signifikanten Reduktion des Faserverlustes, kann diese aber nicht wieder komplett herstellen. VACHT+ Faserdichte illustriert durch Aufnahmen im medialen Striatum. Marke: 50  $\mu\text{m}$ .

\*\* signifikanter Unterschied  $p < 0,001$  und \*  $p < 0,05$ , n. s., nicht signifikant  $p > 0,05$ ; Fehlerbalkendarstellung SEM, Kruskal Wallis One Way ANOVA, post hoc Bonferroni Holm Test.

#### **4.3.2 Abnahme VACHT+ und ChAT+ Neurone ohne Effekt der antiretroviralen Behandlung**

Die durchgeführte quantitative Neuronenanalyse ergab im Vergleich zu der Kontrollgruppe eine Abnahme der Anzahl cholinergischer Neurone im Striatum (s. Abb. 4.5A) in der früheren asymptomatischen Phase der SIV-Infektion (SIV/-AIDS) ( $10,4 \pm 0,9 /\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ), die sich in der SIV/+AIDS Gruppe weiter verstärkte ( $9,15 \pm 0,7 /\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ). Die antiretrovirale Behandlung zeigte keine signifikante Besserung der Neuronenzahl in AIDS im Vergleich zu AIDS ohne Behandlung ( $9,47 \pm 1,9 /\text{mm}^2$ ;  $p > 0,05$ ).

Die Anzahl von VACHT+ Neuronenzählung war im Vergleich zu der Control Gruppe ( $8,13 \pm 0,5$ ) um fast 37% bei der SIV/+AIDS Gruppe ( $5,14 \pm 0,6 /\text{mm}^2$ ;  $p < 0,001$ ) reduziert. Die antiretrovirale führte zu keiner Normalisierung der Neuronenzahl ( $6,13 \pm 0,4 /\text{mm}^2$ ;  $p > 0,05$ ).



**Abb. 4.8: Effekte der lentiviralen Infektion und der antiretroviralen Behandlung auf die striatale ChAT+ und VACHT+ Neuronenzahl.**

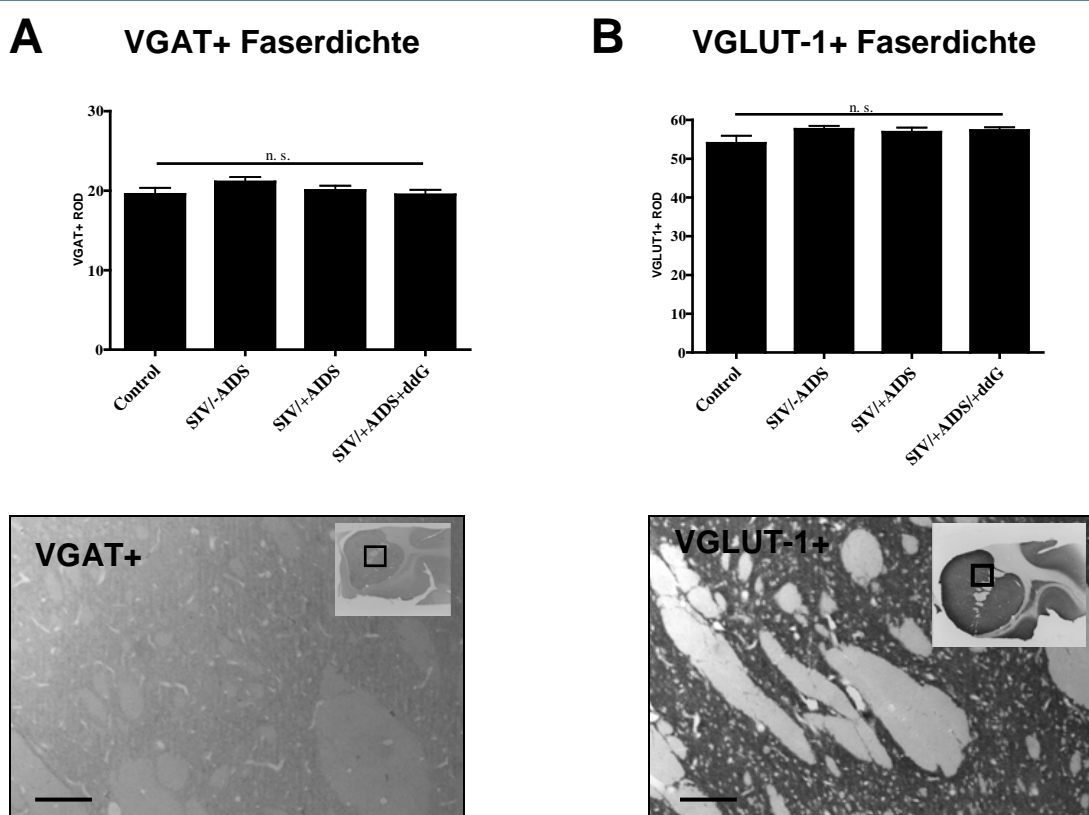
**A:** Graphische Darstellung der ChAT+ Numerik in den vier Versuchsgruppen. Man erkennt bei den SIV/+AIDS- und SIV/+AIDS/+ddG Gruppen eine signifikante Abnahme der ChAT+ Neuronenzahl im Vergleich zur Control Gruppe. In der SIV/+AIDS Gruppe ist bereits eine Abnahme der Neuronenzahl objektivierbar. Unten: Beispielbild der striatalen ChAT+ Neurone (MO89, SIV/+AIDS). Marke: 50 µm.

**B:** Graphische Darstellung der VACHT+ Numerik in den vier Versuchsgruppen. Die signifikante Abnahme der VACHT+ Neuronezahl bei der SIV/+AIDS Gruppe ist auch in der mit 6-CI-ddG behandelten Gruppe zu beobachten. Unten: Beispielbild der striatalen VACHT+ Neurone (MO50, Control.) Marke: 50 µm.

\*\* signifikanter Unterschied  $p < 0,001$  und \*  $p < 0,05$ , n. s., nicht signifikant  $p > 0,05$ ; Fehlerbalkendarstellung SEM, Kruskal Wallis One Way ANOVA, post hoc Bonferroni Holm Test.

#### 4.4 GABAerge und glutamaterge Faserdichte bleiben von lentiviraler Infektion unbeeinflusst

Mögliche Effekte einer lentiviralen Infektion auf die Expression vesikulärer Transmitterproteine für GABA und Glutamat (Typ 1) im Striatum wurden bisher nie untersucht. Nachstehend sind die Ergebnisse für die ROD für VGAT und VGLUT-1 innerhalb der untersuchten Kohorten dargestellt. Ein Effekt einer lentiviralen Infektion auf die vesikulären GABAergen und glutamatergen (Typ1) Transmitterproteine im Striatum konnte nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der jeweiligen optischen Faserdichten ergab annähernd gleiche Werte für die untersuchten Kohorten (s. Abb. 4.6).



**Abb. 4.9: Einfluss einer lentiviralen Infektion auf die GABAerge und glutamaterge Faserinnervation im Striatum.**

**A:** Die Quantifizierung der optischen Faserdichte (ROD: relative optische Dichte) für VGAT+. Unten: VGAT+ Faserdichte demonstriert an einem repräsentativen Gewebeschnitt aus dem Putamen, nahe der Capsula interna (MO74, SIV/+AIDS). Marke: 50µm.

**B:** Analyse der optischen Faserdichte für VGLUT-1 zeigt keinen Unterschied in den untersuchten Kohorten. Unten: VGLUT-1+ Faserdichte dargestellt durch ein repräsentatives Bild aus dem Caudatus, nahe der Capsula interna (MO50, Control). Marke: 50 µm.

n. s., nicht signifikant  $p > 0,05$ ; Fehlerbalkendarstellung SEM, Kruskal Wallis One Way ANOVA, post hoc Bonferroni Holm Test.

## 5 Diskussion

Seit der Einführung der cART im Jahre 1996 gilt die HIV-Infektion als eine behandelbare, jedoch noch immer nicht heilbare Erkrankung. Die gegenwärtige HIV-Medizin wird bei gesteigerter Lebenserwartung der betroffenen Patienten mit einer Prävalenz neurokognitiver und sensomotorischer Störungen durch HIV selbst von ca. 20 bis 50% konfrontiert (Heaton et al., 2010; Simioni et al., 2010). Ein weiteres Problem stellt die Limitierung der neuroprotektiven Effekte einer antiretroviralen Behandlung dar. Forschungsarbeiten belegen, dass der Effekt der cART in Bezug auf das Maß und die Beständigkeit einer neuroprotektiven Behandlung begrenzt ist (Sacktor et al., 2001; Brew, 2004; Antinori et al., 2007; Tan und McArthur, 2011). Dies rückt die Erforschung der HIV-Neuropathologie und neuer Behandlungsstrategien in den Fokus gegenwärtiger Forschungsarbeiten. Ob eine mögliche Dysfunktion der vesikulären Speicherung von Neurotransmittern zu der HIV-Neuropathogenese beiträgt, wurde bisher kaum untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer lentiviralen Infektion und deren antiretroviraler Behandlung auf die Expression von vesikulären Transmitterproteinen im Striatum von Rhesus Affen zu untersuchen. Hierfür wurden histomorphologische Analysen der Striata für die untersuchten Versuchsgruppen durchgeführt. Ergänzend wurden die Viruslast sowie die Neuroinflammation über die mikrogliale und astrozytäre Entzündungsreaktion immunhistochemisch analysiert.

Zunächst werden hier die erhobenen Daten zusammenfassend erläutert und nachfolgend deren Bedeutung einzeln diskutiert.

Die erhaltenen Ergebnisse legen die Interpretation nahe, dass eine lentivirale Infektion bereits in der frühen asymptomatischen Phase der SIV/HIV-Infektion zu einer Beeinträchtigung der DOPA/DAergen und cholinergen Neurotransmitter im Striatum führt. SIV/HIV schädigt die VACHT+ cholinerge und VMAT-2+ monoaminerge Innervation im Striatum. Die antiretrovirale Behandlung mit 6-CI-ddG normalisiert weder die SIV-induzierte Reduktion der VACHT+ cholinergen noch die der VMAT-2+ monoaminergen Fasern/Synapsen wieder um. Im Gegensatz dazu wird die SIV-induzierte Reduktion von TH+ Fasern im Striatum durch die antiretrovirale Behandlung zu einem großen Teil wieder rückgängig gemacht. Dies deutet auf verschiedene Effekte der 6-CI-ddG Behandlung bezüglich der Synthese und Kompartimentierung von DA hin. Zusätzlich kann eine hier beobachtete Reduktion der cholinergen in striatalen Neurone ein mitverursachender Faktor für die Entstehung von motorischen Störungen bei Neuro-AIDS sein. Die striatale VGAT+ GABAerge und VGLUT-1+ glutamaterge Innervation bleiben dagegen während der SIV-Infektion

unbeeinflusst. Transiente und oder auch permanente Störungen der Neurotransmitterhomöostase, die bereits in der frühen, asymptomatischen SIV/HIV-Infektionsphase beobachtet wurden, erfordern den rechtzeitigen Einsatz von lipophilen, antiretroviralen Therapeutika.

### **5.1 Reversibilität der SIV-induzierten mikroglialen Entzündungsreaktion durch die antiretrovirale Therapie**

Die Analyse der mikroglialen Entzündungsreaktion erfolgte durch die morphologische Analyse der Iba-1+ Mikrogliazellen in den Versuchsgruppen. Als einzige ortsansässige Immunzellen des ZNS leiten die Mikrogliazellen die Immunantwort bei entsprechenden Stimuli ein. Iba-1 gilt als anerkannter Mikroglia/Makrophagenmarker, welche im Rahmen von inflammatorischen Prozessen durch eine verstärkte Aktivierung Änderungen ihrer Morphologie vollziehen. Diese zeigt sich in der Umwandlung ihrer ruhenden, ramifizierenden, zu einer hypertrophen, aktivierten Form (Kreutzberg, 1996).

Das Ergebniss dieser Arbeit spiegelt auch die Befunde von anderen Arbeitsgruppen wieder, dass die Viruslast mit dem Vorhandensein von Mikrogliaknötchen und multinukleären Riesenzellen assoziiert ist, und dass deren Auftreten durch eine BHS-gängige antiretrovirale Therapie reduziert wird (Depboylu et al., 2004, 2006, 2011; Xing et al., 2008). Die Mikrogliaaktivierung im Striatum zeigt sich besonders erhöht in der an AIDS erkrankten Gruppe und erfährt einen Rückgang durch die 6-CI-ddG Behandlung.

Die SIV-induzierten Veränderungen der Neurotransmitterfunktionalität hingegen treten auch zum Teil bereits in der asymptomatischen Phase der SIV-Erkrankung, in der bereits eine Mikrogliaaktivierung nachweisbar ist, auf. Nicht alle hier analysierten neurochemischen Markerproteine reagieren auf die antiretrovirale Behandlung mit einer Erholung ihrer Faserdichte/Neuronenzahl. Die offensichtliche Korrelation zwischen der Viruslast und dem Entzündungsgeschehen im ZNS stützt die bereits erwähnte Hypothese, dass die virale Replikation das Entzündungsgeschehen triggert. Die Ergebnisse, dass auch das SI-Virus bei der behandelten Gruppe nicht mehr nachweisbar ist, zeigt nochmals die Bedeutung und Notwendigkeit einer frühen therapeutischen Intervention an, bereits zu Beginn der lentiviralen Infektion die Viruslast im ZNS zu kontrollieren, um nachhaltige Schädigungen zu präventieren.

### **5.2 Reversibilität der SIV-induzierten Astrozytose durch die antiretrovirale Behandlung**

Neben dem Vorkommen aktivierter Mikrogliazellen werden auch aktivierte Astrozyten im Parenchym des ZNS während einer SIV/HIV-induzierten Neuroinflammation

beobachtet. GFAP ist als Hauptstrukturprotein von Astrozyten spezifisch für diese im ZNS. Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation von Astrozyten. In diesen hypertrophierten Astrozyten kommt es zu einer gesteigerten GFAP-Produktion. Diese veränderte Astrozytenmorphologie und Zunahme der Astrozytenzahl wird als Astrogliose bezeichnet. Die Veränderungen der Astrozyten können zu Funktionseinbußen ihrer vielfältigen Aufgaben wie die Aufrechterhaltung der BHS, die Beteiligung an der neuronalen Signaltransduktion und auch die Gewährleistung ihrer neuroprotektiven Rolle führen. Diese Auswirkungen begründen den Bedarf, das Ausmaß einer Astrogliose bei Neuro-AIDS darzustellen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es bei der an AIDS erkrankten Gruppe zu einer signifikanten Induktion einer Astrogliose im Striatum kommt. Die antiretrovirale Behandlung erweist sich hier als eine effektive Therapie. Die hier dargestellte Astrogliose deckt sich mit Ergebnissen vorangegangener Arbeiten. Sie gilt als ein Kennzeichen der HIV/SIV-Enzephalitis (Letvin und King, 1990; Weihe et al., 1993; Brew et al., 1995). Neben der reaktiven Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, der Modulation von K<sup>+</sup>-Kanälen, die zu einer gesteigerten Depolarisation von Neuronen führt, bewirken sie zusätzlich eine Verstärkung der Glutamat-Exzitotoxizität und tragen somit in einem großen Ausmaß zu der HIV-assoziierten Neuropathologie bei (Ton und Huangui, 2013).

Diese Mechanismen begründen wahrscheinlich auch die in dieser Arbeit beobachtete Astrogliose in striatalen Geweben von an AIDS erkrankten Tieren und stellen einen Anreiz für die weitere Erforschung der Rolle einer Astrogliose als möglicher Mitverursacher der im Striatum beobachteten Störung der Neurotransmission.

### **5.3 Deutliche Restitution des TH+ Faserverlustes durch die antiretrovirale Therapie**

Nigrostriatale DAerge Neurone bilden die größte Quelle für striatale TH+ Fasern. Als Schrittmacherenzym der Katecholaminsynthese ist TH an der DAergen Informationsmodulation im Striatum maßgeblich beteiligt. Bekanntermaßen kommt es während einer lentiviralen Infektion zu einer Störung der DAergen Neurotransmission im Striatum, die mitursächlich für die Entstehung von Neuro-AIDS angesehen wird (s. Kapitel 1.2.3.6). Berger und Arendt (2000) benennen die Basalganglien als ein "Hauptziel der HIV-Infektion". Bereits 1996 bezeichneten Sarder et al. das DA-Defizit als "neurochemische Basis von Parkinson-Symptomen bei AIDS". Koutsilierie et al. (2002) wiesen auf die "Beteiligung von DA in der Progression der HAD" hin.

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine SIV/AIDS-Erkrankung zu einer signifikanten Reduktion der DAergen (TH+) Faserdichte im Striatum führt. Eine bekannte Ursache für die Störung der TH-Funktion ist die durch das retrovirale tat-Protein, das neben der Aktivierung und Beschleunigung der viralen Genreplikation auch an der Mikrogliaaktivierung beteiligt ist, ausgelöste verminderte Expression der TH in DAergen Neuronen der SNc. Entsprechend wurden bei AIDS-Patienten Parkinson-ähnliche motorische Symptome beschrieben (Zauli et al., 2000; D'Aversa et al., 2005). Das retrovirale Hüllprotein gp120 löste bei Ratten nach striataler Injektion eine Abnahme der TH+ Faserdichte aus. Neben einem apoptotischen neuronalen Zelltod und einem Faserverlust im Striatum konnte sogar eine retrograde Degeneration DAerger Neurone in der SNc beobachtet werden (Nosheny et al., 2006).

Eine bereits im asymptomatischen Stadium der SIV-Infektion beschriebene Störung der TH+ Faserinnervation (Scheller et al., 2005) konnte dagegen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Die antiretrovirale Therapie mit dem BHS-gängigen 6-CI-ddG konnte die SIV-induzierte Reduktion von TH+ Faser mindern, aber nicht wieder komplett normalisieren. 6-CI-ddG wurde als Vertreter der NRTIs speziell für die Erforschung einer antiretroviralen Behandlung bei Neuro-AIDS entwickelt. Es erfüllt die hierfür notwendigen Eigenschaften wie eine für die BHS-Gängigkeit notwendige hohe Lipophilie, einen großen antiretroviralen Effekt und eine Verbesserung der neurologischen Symptome (Fujii et al., 1998; Otani et al., 1997; Depboylu et al., 2004). Ob eine Behandlung durch 6-CI-ddG zu einer Erholung der DAergen Faserinnervation im Striatum führt, wurde bisher nicht untersucht.

Therapeutische Überlegungen, um das zentrale DA-Defizit bei HIV/AIDS-Patienten wieder auszugleichen, haben zu einer Vielzahl von experimentellen Ansätzen geführt. Der Versuch, das DA-Defizit mit L-DOPA oder Selegilin wieder auszugleichen, führte bei SIV-infizierten Affen zu gesteigerten DA-Konzentrationen, aber auch zu einer Erhöhung der Viruslast und zu einer Zunahme von neuropathologischen Läsionen im ZNS (Czub et al., 2001). Schlussfolgernd wurde angenommen, dass eine erhöhte zentrale DA-Verfügbarkeit zu einer Progression von Neuro-AIDS führt. Da DA, neben seiner Funktion als Neurotransmitter mit neurotoxischem Potential, auch als ein immunmodulatorisches Molekül die Makrophagenfunktion reguliert, wurde dessen Einfluss auf die HIV-Neuropathogenese weiter erforscht. Gaskill et al. (2012) gelang der Nachweis, dass humane Makrophagen die mRNA für alle DA-Rezeptorarten synthetisieren können. Außerdem konnten sie aufzeigen, dass DA selbst auch die Sekretion von Zytokinen wie IL-10 moduliert. Erhöhte extrazelluläre DA-Konzentrationen führen neben einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen auch zu



einer Steigerung der HIV-Replikation durch die vermehrte Expression von D2-Rezeptoren in Makrophagen (Gaskill et al., 2009). Eine erhöhte Anzahl von HIV-infizierten Makrophagen führt durch deren gesteigerte Produktion von neurotoxischen Substanzen zu einer Progression von Neuro-AIDS (Anderson et al., 2002; Kramer-Hämmerle et al., 2005; Aquaro et al., 2005). Demnach spielt die HIV-Infektion in Makrophagen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von HAND. Diese Entdeckungen wurden durch Beobachtungen an HIV-Patienten, die die DA-Konzentration im ZNS steigernde Drogen wie Metamphetamin oder Kokain konsumierten, bestätigt. Es stellte sich heraus, dass es dadurch zu gesteigerten DA-Konzentrationen im synaptischen Spalt kommt, was wiederum zu einer vermehrten Aktivierung von Mikroglia führt und in der Folge zu einer Erhöhung der zentralen Viruslast sowie zu einer Steigerung der neuroinflammatorischen Prozesse (Purohit et al., 2011). Ebenfalls im SIV-Modell wurde der neuroprotektive Effekt einer frühzeitig initiierten Minocyclin-Therapie diskutiert. Das Tetracyklinderivat Minocyclin führte zu einer Reduktion der Viruslast in den Basalganglien und zeigte auch einen guten Effekt gegen neuroinflammatorische Prozesse (Zink et al., 2005; Ratai et al., 2010; Campbell et al., 2011). Daneben schützte Minocyclin auch vor einem SIV-induzierten striatalen DA-Verlust (Meulendyke et al., 2012).

Die in dieser Arbeit gezeigten Auswirkungen einer lentiviralen Infektion auf die TH+ Faserdichte im Striatum untermauern die notwendige neuroprotektive Therapie bei HIV-Patienten. Diese besteht in der Anwendung liquorgängiger antiretroviraler Substanzen bereits zu Beginn der HIV-Infektion mit dem Ziel, die Viruslast, als den die AIDS-Neuropathologie bestimmenden Faktor, im ZNS zu supprimieren (Eggers, 2014). Auch werden die neurotoxischen Effekte einer cART als mögliche Ursache für neurologische Symptome bei HIV/AIDS-Patienten diskutiert. So zeigten sich neurokognitive Störungen, die sich nach Absetzen der cART besserten (Al-Kindhi et al., 2011; Heaton et al., 2011; Grund et al., 2013).

### **5.3.1 Unveränderte Zahl von TH+ Neuronen im Striatum**

TH+ Neurone im Striatum repräsentieren eine Subpopulation von Interneuronen, genauer die GABAergen Interneurone (s. Kapitel 1.2.2), die ca. 5% der striatalen Neuronenpopulation ausmachen (Tepper et al., 2010; Unal et al., 2011). In dieser Arbeit wurden die striatalen TH+ Neurone im Hinblick auf mögliche reaktive Zellzahlveränderungen im Striatum von SIV-infizierten Affen analysiert.

Die IF-Analyse konnte zeigen, dass es sich bei der Mehrheit der untersuchten Neurone um TH und AADC koexprimierende Neurone handelt, die kein VMAT-2 haben. Die

Expression von TH verleiht ihnen einen DOPAergen Charakter und ihre mehrheitliche Ausstattung mit AADC zeigt, dass sie zu einer DA-Synthese fähig sind. Der genaue Mechanismus ihrer möglichen DOPA/DA-Speicherung/Abgabe bleibt jedoch bei fehlender VMAT-2-Expression unklar. Die Annahme, dass die untersuchten Neurone eine non-exozytotische VMAT-2-unabhängige Neurotransmission vollziehen, wird durch den Nachweis von DAT bei TH+ intrastriatalen Neuronen von humanen und nicht humanen Primaten gestützt (Cossette et al., 2005; Tande et al., 2006; Huot et al., 2007).

Eine Reihe von Arbeiten haben eine Zunahme der TH+ Neuronenzahl bei DAerger Denervation des Striatums nachweisen können (Tashiro et al., 1989; Betarbet et al., 1997; Huot und Parent, 2007; Tandee et al., 2006; Depboylu, 2014; Depboylu et al., 2014). Diese Beobachtung wird dahingehend interpretiert, dass die TH+ Neurone einen Kompensationsmechanismus gegen den lokalen DA-Verlust durch eine reaktive DA-Synthese bewerkstelligen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten IHC-Analysen sind im Hinblick auf die kleine Morphologie der TH+ Neurone im Striatum und die mögliche Überlagerung und dadurch Verknennung von TH+ Neuronen durch nigrostriatale TH+ Fasern kritisierbar (Dubach et al., 1997; Mazloom und Smith, 2006). Um die Möglichkeit einer Verzerrung der Ergebnisse zu minimieren, wurden nur TH+ Neurone mit einer deutlichen zellulären Morphologie und sichtbarem Zellkern in die Analyse einbezogen.

Eine reaktive Zunahme oder Abnahme der TH+ Neuronenzahl bei Reduktion der TH-Innervation durch eine lentivirale Infektion konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

#### **5.4 Bedeutung der irreversiblen Reduktion der VMAT-2+ Faserdichte**

In dieser Studie konnte erstmals im Affen-Modell der HIV-Infektion gezeigt werden, dass eine lentivirale Infektion bei an AIDS erkrankten Tieren zu einer Abnahme der VMAT-2+ Innervation im Striatum führt. Bemerkenswert ist, dass die antiretrovirale Behandlung mit dem BHS-gängigen 6-CI-ddG nicht zu einer Restitution der VMAT-2+ Faserdichte führte. Bei den mit SIV-inokulierten, aber nicht an AIDS erkrankten Tieren fand sich noch keine Reduktion der VMAT-2+ Faserdichte.

Die weitreichenden Auswirkungen einer beeinträchtigten VMAT-2-Funktion werden in vielzähligen Arbeiten aufgezeigt. Eine regelrechte vesikuläre Verpackung von DA ist für die Aufrechterhaltung einer neuronalen Integrität entscheidend. DAerge Neurone reagieren besonders sensitiv auf inflammatorische Prozesse und oxidativen Stress

(Barnum und Tansey, 2010). Das basische zytosolische Milieu führt dazu, dass extravesikulär gelagerte DA-Moleküle autooxidieren und dadurch hoch reaktive DA-Quinone und Superoxide bilden. Zusätzlich führt der Metabolismus von DA durch MAO zur Bildung des Nebenprodukts  $H_2O_2$ , das auch eine hohe toxische Wirkung auf DAerge Neurone hat (Agrawalet al., 2010). Eine VMAT-2-Hemmung könnte bei dementsprechend erhöhten zytosolischen DA-Konzentrationen zu einer gesteigerten Schädigung von Neuronen und Neuronenfortsätzen führen. Vor allem wurde die Bedeutung und der Ablauf dieser Mechanismen als eine mögliche Ursache für die Pathogenese des Parkinson-Syndroms untersucht (Burke et al., 2004; Rees et al., 2009; Goldstein et al., 2001; Zahid et al., 2011; Alter et al., 2013).

Das HIV-tat-Protein, das für die virale Replikation essentiell ist, wird von infizierten Zellen als ein aktives Protein ausgeschüttet (Dingwall et al., 1989; Ensoli et al., 1990). Dem tat-Protein wird eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der HAD zugesprochen (Hudson et al., 2000; Ferris et al., 2008). Auch wird die durch das tat-Protein bedingte Neurotoxizität als eine die DAerge Dysfunktion bei HIV/AIDS als mit verursachen diskutiert (Berger und Arendt, 2000). Neben seiner Auswirkung auf die TH-Expression (s. Kapitel 5.1) wurde das HIV-tat-Protein auch auf eine mögliche Hemmung von VMAT-2 und somit einer Veränderung der DA-Sequestrierung im Striatum untersucht. Dafür wurde in die Striata von Ratten das rekombinante HIV-tat<sub>1-72</sub> verabreicht. Der Effekt der DA-Aufnahme in synaptosomale Vesikel wurde durch das tat nachweislich um ca. 35% gesenkt (Theodore et al., 2012).

Die DAerge Neurotransmission wird v. a. durch die biochemische Interaktion zwischen VMAT-2 und DAT reguliert. Die Wiederaufnahme von DA durch DAT bildet den Hauptmechanismus für die Regulation des extrazellulären DA-Gehaltes (Gainetdinov und Caron, 2003). Klinische PET-Studien belegten eine signifikante Reduktion der DAT-Dichte im Striatum von HIV-Patienten mit HAD (Wang et al., 2004; Chang et al., 2008). Es wurde angenommen, dass die durch das tat-Protein induzierte Neurotoxizität durch dessen Reduktion der DAT-Aktivität begründet ist (Ferris et al., 2008; Zhu et al., 2009). Im experimentellen Rattenmodell stellte sich heraus, dass das tat-Protein neben einem Proteinkinase C medierten Mechanismus zur Inhibition der DAT-Aktivität auch zu einer Reduktion der VMAT-2-Expression führte und somit an der Entstehung der Dysfunktion der DAergen Neurotransmission bei HIV-Patienten beteiligt war (Midde et al., 2012). Zusätzlich wird die Auswirkung des tat-Proteins auch durch den Effekt von sympathomimetisch wirkenden Drogen wie Metamphetamin hervorgehoben. Diese üben ihre neurotoxische Wirkung an denselben Strukturen wie das tat-Protein aus. Bei HIV-Patienten, die psychostimulierende Substanzen konsumierten, wurden viel schwerwiegendere Manifestationen von Neuro-AIDS beobachtet (Bouwman et al.,

1998). Bei der experimentellen Exposition von striatalen Zellkulturen von Ratten mit Metamphetamin und dem tat-Protein wurde deren synergistisch-toxischer Effekt durch eine Zunahme des oxidativen Stresses und einer Degeneration der DAergen Terminalen im Striatum aufgezeigt (Theodore et al., 2006a, 2006b).

Die hier durchgeführten IF-Analysen konnten eine Kollokalisierung von VMAT-2 in den meisten TH+ Fasern des Striatums, die hauptsächlich die DAergen Afferenzen aus der SN und anteilig die serotonergen Fasern aus den Raphe-Kernen repräsentieren, nachweisen. Die dargestellte Erholung der TH+ Faserdichte durch die antiretrovirale Therapie zeigt am ehesten eine Regenerationsfähigkeit der DOPA/DAergen Neurotransmission im Striatum. Die Bedeutung der Reduktion der "protektiven" VMAT-2+ Faserdichte im Striatum von an AIDS erkrankten Rhesus Affen legt nahe, dass es bei unzureichender vesikulärer Kompartimentierung zu einer Zunahme der neurotoxischen Wirkung von DA kommen kann.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte Ineffizienz des lipophilen NRTIs 6-Cl-ddG wirft Fragen für andere adäquate Therapieoptionen auf. VMAT-2 wird gegenwärtig immer mehr als ein möglicher Angriffspunkt für die Therapie von neurologischen Krankheiten wie Morbus Huntington, Dystonie, Schizophrenie, Suchterkrankungen, Depressionen oder Morbus Parkinson diskutiert. VMAT-2 als direktes pharmakologisches Ziel allein oder in Kombination mit bereits angewendeten Substanzen, würde eine neuartige Modulation der Neurotransmission durch Aufrechterhaltung der ursprünglichen exozytotischen Signalvermittlung und deren Termination bewirken. Dieser pharmakologische Ansatz verspricht eine Reduktion von Nebenwirkungen und Medikamentenresistenzen, die durch erhöhte synaptische Neurotransmitterkonzentration oder kompensatorische Veränderungen von Rezeptoraffinitäten oder -expressionen entstehen, wie sie beispielsweise bei der medikamentösen Behandlung des Morbus Parkinson beobachtet werden. Bekannte Substanzen, die auf die VMAT-2-Expression wirken können, sind z. B. der D2-Agonist Pramipexol oder der D1/D2-Agonist Apomorphin. Neben einer Verstärkung der vesikulären DA-Aufnahme wird ihnen ein neuroprotektiver Effekt zugesprochen (Truong et al., 2003, 2004). Das Amphetaminderivat Methylphenidat konnte im Rattenmodell auch die vesikuläre DA-Aufnahme steigern und somit persistierende DA-Mängel wieder ausgleichen (Sandoval et al., 2002; Hanson et al., 2004). Bei Metamphetamin-induziertem oxidativem Stress führte das Hormon PACAP38 zu einer vermehrten VMAT-2-Expression im Striatum (Guillot et al., 2008).

Leider limitieren die gegenwärtig für VMAT-2 verfügbaren Analyseinstrumente eine pharmakologische Erprobung von neuen Substanzen. Radioaktive Liganden, die zu einem besseren Verständnis der VMAT-2-Funktionalität geführt haben, erweisen sich

als ungeeignet, um ein großes Studienkollektiv von Versuchstieren zu untersuchen. Auch die Erforschung von Zellkulturen zeigt eine Limitierung der Validität von in vivo Experimenten (Bernstein et al., 2014).

### **5.5 SIV-induzierte Reduktion der ChAT+ und VAcHt+ Neuronenzahl bei unveränderter ChAT+ Faserdichte im Striatum**

Die im Striatum vorkommenden cholinergen Interneurone bilden nur ca. 2-3% der im Striatum vorkommenden Neuronenpopulation. Ihre Aufgabe besteht in der Modulation der GABAergen MSNs, die durch cortikostriatale Efferenzen aktiviert werden, im Striatum (s. Kapitel 1.2.3.5). Das ACh synthetisierende Enzym ChAT ist ein Marker, um den Funktionszustand cholinergischer Neurone im ZNS beurteilen zu können (Oda, 1999). Seine Quantifizierung in bestimmten Hirnregionen erlaubt die mögliche Abschätzung kognitiver Dysfunktionen.

In dieser Arbeit wurden die ChAT+ Neurone im Striatum auf eine durch eine lentivirale Infektion ausgelöste mögliche Veränderung der Zellzahl untersucht. Die Analysen ergaben eine bereits in der frühen Phase der SIV-Infektion beginnende und sich nach Ausbruch der AIDS-Erkrankung weiter steigende allerdings geringfügige Reduktion der ChAT+ Neuronenzahl im Striatum. Die antiretrovirale Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die Reduktion der ChAT+ Neurone.

Vergleichbare Ergebnisse wurden im SIV-Modell belegt. Es wurde eine starke Reduktion der ChAT-Aktivität im Putamen- und Hippokampusgewebshomogenaten bereits im asymptomatischen Stadium der SIV-Infektion gemessen, die zudem keinen Zusammenhang mit der Höhe der Viruslast im Gehirn zeigte. Diese frühe ChAT-Reduktion wurde dahingehend interpretiert, dass eine Dysfunktion cholinergischer Neurone im ZNS auftritt, die die Pathogenese von HAD mit begründen (Koutsilieri et al., 2000). Dabei wurde nicht gezeigt, ob die cholinerge Dysfunktion durch eine Zerstörung von cholinergen Neuronen oder durch ein biochemisches ACh-Defizit ausgelöst wurde.

Die Subklassenunterteilung der HAND in asymptomatische (ANI), milde (MND) und schwere (HAD) Unterformen dient der Beurteilung des Schweregrades einer kognitiven Beeinträchtigung, die durch eine HIV-Infektion ausgelöst wird. Davon müssen kognitive Störungen abgegrenzt werden, die durch Koinfektionen, Malnutrition, psychische Begleiterkrankungen, Drogenmißbrauch und die medikamentöse Therapie selbst entstehen (Letendre, 2011). Während sich die Prävalenz von HAND annähernd unverändert bei ca. 44% der HIV/AIDS-Patienten darstellt, hat sich seit Einführung der antiretroviralen Kombinationstherapie der Schwerpunkt der Ausprägung zu den mildereren Formen hin verschoben (Elbirt et al., 2015). Die Bedeutung einer frühzeitigen

HAND-Diagnostik wird dadurch ersichtlich, dass eine ANI zu einer zwei bis sechsfach erhöhten Wahrscheinlichkeit für die symptomatische Ausprägung einer HAND führt (Grant et al., 2014). Die Notwendigkeit einer besseren Erfassung von betroffenen Patienten hat dazu geführt, dass in den letzten Jahren viele neue Diagnoseelemente entworfen wurden. Die CHARTER (CNS-HIV-Antiretroviral-Therapy-Effects)-Gruppe wurde 2002 gegründet und hat als eine der ersten Gruppen antiretrovirale Medikamente auf ihre Wirksamkeit gegen den ZNS-Befall untersucht. Sie entwarfen numerische Einstufungsgrade (CPE: CNS-Penetration-Effectiveness-Score) für die ZNS-Gängigkeit von antiretroviralen Medikamenten, die sich auf die Viruslast in Liquorproben stützen. Die erzielten Studienergebnisse ergaben jedoch widersprüchliche Korrelationen zwischen einem hohem CPE-Score und der in den Studiengruppen beobachteten Ausprägung der kognitiven Beeinträchtigungen. Das Auftreten von neurokognitiven Symptomen wurde bei nicht nachweisbarer Virusreplikation im Liquor beobachtet (Marra et al., 2009). Diese Ergebnisse betonen den neurotoxischen Effekt von ZNS-gängigen HIV-Medikamenten und führen zu Diskussionen, wie und in welchem Umfang eine antiretrovirale Therapie in der Behandlung von HAND eingesetzt werden sollte.

Auch die mangelnde Fähigkeit von 6-CI-ddG, den in dieser Arbeit gezeigten Verlust von striatalen ChAT+ Neuronen zu verhindern, könnte durch eventuelle neurotoxische Effekte dieses NRTIs begründet sein. Mögliche neurotoxische Effekte von 6-CI-ddG hätten durch eine Erprobung dieses Medikaments an gesunden Versuchstieren untersucht werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es durch die lentivirale Infektion bereits in frühen Stadien zu einer irreversiblen Schädigung von cholinergen Neuronen im Striatum kommt. Inwieweit die hier gemessene Reduktion der ChAT+ Neurone von ca. 13% eine funktionelle Relevanz hat, konnte in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert werden. Die Tatsache, dass es hingegen nicht zu einer Beeinträchtigung der ChAT+ Faserdichte im Striatum gekommen ist, lässt zusätzlich vermuten, dass das Ausmaß der cholinergen Dysfunktion striatal noch begrenzt war. Da die cholinergen Interneurone im Striatum trotz ihrer begrenzten Anzahl eine mit am stärksten mit ACh ausgestattete Region im ZNS darstellen (s. Kapitel 1.2.3.5), bilden sie möglicherweise ein großes Potential für Kompensationsmechanismen gegen eine begrenzte cholinerge Dysfunktion.

Ergänzend zu der Analyse der ChAT+ Neurone wurde die VACHT+ Neuronenzahl auf mögliche Veränderungen durch eine lentivirale Infektion untersucht. Wie bei den ChAT+ Neuronen konnte in der an AIDS erkrankten Gruppe eine Reduktion der VACHT+ Neuronenzahl objektiviert werden, die sich durch die antiretrovirale Therapie nicht besserte. In Analogie zu der ChAT+ Neuronenzahlanalyse konnte die SIV/-AIDS

Gruppe hier leider nicht analysiert werden, da nicht mehr genügend Gewebeschnitte zur Verfügung standen.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene, SIV-induzierte Reduktion der ChAT+ und VAcHT+ Neuronenzahl belegt, dass es zu einem irreversiblen realen Verlust von cholinergen Neuronen im Striatum während der lentiviralen Infektion kommt.

## **5.6 Bedeutung der nur teilweise reversiblen VAcHT+ Faserdichte**

Cholinerge Neurone im Striatum bilden die einzige Quelle für die cholinerge Innervation der MSNs. Die spontane Entladungsrate der cholinergen Neurone gewährleistet einen hohen extrazellulären ACh-Gehalt (Bennett und Wilson, 1999; Wilson, 2005). Für die Aufrechterhaltung der cholinergen Neurotransmission sind hohe ACh-Freisetzungen notwendig. Dies erfordert die effiziente Aktivität von VAcHT (Parsons, 2000).

Die Auswirkung einer lentiviralen Infektion auf die VAcHT+ Faserdichte im Striatum wurde bisher nicht untersucht.

Vor Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die VAcHT+ Faserdichte in AIDS bei Rhesus Affen im frontalen, parietalen und hippocampal-entorhinalen Cortex irreversibel reduziert ist (Depboylu et al., 2012). In diesem Zusammenhang wurde eine verminderte COX-1-Expression in den cholinergen Projektionsneuronen des basalen Vorderhirnkomplexes nachgewiesen (Depboylu et al., 2012). Eine verminderte Synthese von Prostaglandinen, denen eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen wird, bietet eine Erklärung für die beschriebene Schädigung der Fortsätze und Terminale von cholinergen Projektionsneuronen (Depboylu et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde auch im Striatum eine durch eine SIV/AIDS ausgelöste Reduktion der VAcHT+ Faserdichte gefunden. Die antiretrovirale Behandlung zeigte eine nur geringe Minderung der striatalen striatalen VAcHT-Innervation. Die Ergebnisse deuten auf einen Verlust von VAcHT+ Fasern bei unbeeinträchtigter ChAT+ Innervation im Striatum während der SIV-Infektion. VAcHT ist ein besserer Marker für cholinerge Terminalen als ChAT. IHC-Antikörper gegen VAcHT erlauben eine sensitivere Darstellung von cholinergen Terminalen. ChAT ist in den Perikarya und proximalen/grösseren (Zellkörper-nahen) Fortsätzen konzentriert und in den Endigungen spärlicher als VAcHT exprimiert.

Die Deutung einer VAcHT-Funktionsstörung wird durch die gleichzeitige Expression von VGLUT-3 in cholinergen Neuronen im Striatum erschwert (s. Kapitel 1.3.3). Diese können sowohl ACh als auch Glutamat speichern und freisetzen (Ren et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ein und dieselben Neuronen an der Modulation von

verschiedenen Wegen beteiligt sein können. Die selektive VACHT-Blockierung in einem eigens hierfür geschaffenem Mausmodell führte neben einer Reduktion der cholinergen Aktivität im Striatum zu einer Verstärkung der DA-Affinität der MSNs (Guzman et al., 2011). DA und ACh erfüllen gegensätzliche Funktionen in der Modulation der striatalen Efferenzen. Die Aufrechterhaltung ihres Gleichgewichts ist essentiell für die striatale Funktionstüchtigkeit (Calabresi et al., 2000; Zhu et al., 2002). Die Komplexität der intrastriatalen cholinergen Neurotransmission wurde durch den Nachweis, dass VGLUT-3 die ChAT-Aktivität beeinflusst, dargestellt. Ein VGLUT-3-Verlust induzierte bei den untersuchten Mäusen einen hypocholinergen Phänotyp (Gras et al., 2008). Aus den bisher gewonnen Erkenntnissen über die komplexen Regulationsmechanismen cholinergischer Interneurone im Striatum lassen sich nur vage Aussagen über das Ausmaß und die Folgen eines cholinergen Funktionsverlustes treffen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine Schädigung der synaptischen cholinergen Neurotransmission, die begründet ist durch ein gestörtes Gleichgewicht bei der vesikulären Speicherung von ACh. Diese grösstenteils irreversible Schädigung der cholinergen Neurotransmission legt nahe, dass eine frühe Intervention mit effizienten, BHS-gängigen antiretroviralen Medikamenten notwendig ist.

### **5.7 Keine Beeinträchtigung vesikulärer Speicherproteine für GABA und Glutamat während der SIV-Infektion**

Die Analyse eines möglichen Effektes einer lentiviralen Infektion auf die VGAT+ und VGLUT-1+ Faserdichte im Striatum ergab keine Unterschiede in den untersuchten Gruppen.

Glutamat, auch bekannt als Exzitotoxin, kann bei einer Dysregulation der glutamatergen Neurotransmission zu einer Schädigung von Neuronen und deren Terminalen führen (Doble, 1999; Lynch und Guttman, 2002). Als wesentlichen Einflussfaktor hierfür wird die Expressionsart der NMDA-Rezeptoren auf den glutamatergen Neuronen gesehen (Liu et al., 2007). Zahlreiche Studien erbrachten Hinweise, dass Glutamat durch seine exzitotoxischen Eigenschaften an der Entstehung der HAND beteiligt ist. Die HIV-Infektion von Makrophagen und Mikrogliazellen verursacht eine exzessive Glutamat-Ausschüttung verbunden mit einer reduzierten Glutamat-Wiederaufnahme (Potter et al., 2013). So wurde gezeigt, dass das HIV-tat-Protein seine neurotoxische Wirkung auch über eine NMDAR-Aktivierung entfaltet (Wang et al., 1999). Auch wurde eine neuronale Zellschädigung durch eine NMDAR-Überaktivierung, die bedingt ist durch die HIV induzierten inflammatorischen



Prozesse, gezeigt (Kaul et al., 2001). Zudem wurde bewiesen, dass es bereits im asymptomatischen Stadium einer SIV-Infektion zu einer Steigerung der Glutamat-Konzentration kommt (Bossuet et al., 2004). Wegen der Überlegung, dass eine lentiviral bedingte Dysregulation der glutamatergen Vesikelproteine auch an der Glutamat-Exzitotoxizität in neuronalen Strukturen beteiligt sein könnte, wurde die VGLUT-1+ Faserdichte im Striatum analysiert.

Ergänzend zu der Analyse der glutamatergen Vesikelproteine wurden auch die GABAergen vesikulären Transmitterproteine im Hinblick auf mögliche Veränderungen untersucht. Da Glutamat und GABA Neurotransmitter sind, die in hohen Mengen in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen synthetisiert werden, würden Veränderungen ihrer Faserinnervation auf eine Störung der entsprechenden Neurotransmission hinweisen. Warum die VGAT+ und VGLUT-1+ Fassern trotz ihres ubiquitären Vorkommens im ZNS möglicherweise resistenter sind gegenüber inflammatorischen Prozessen, wie sie nachweislich für eine SIV/HIV-Infektion beschrieben werden, ist und bleibt unklar. Bisher wurden keine durch eine lentivirale Infektion bedingten Dysfunktionen GABAerger Neurone und ihrer Fortsätze beschrieben.

## 6 Literaturverzeichnis

- Agrawal L, Louboutin JP, Marusich E, Reyes BAS, Van Bockstaele EJ, Strayer DS. 2010. Dopaminergic neurotoxicity of HIV-1 gp120: reactive oxygen species as signaling intermediates. *Brain Res*, 1306, 116–130.
- Albin RL. 1995. The pathophysiology of chorea/ballism and Parkinsonism. *Park Rel Dis*, 1(1), 3–11.
- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*, 13(7), 266–271.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. 1990. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res*, 85, 119–146.
- Al-Khindi T, Zakzanis KK, van Gorp WG. 2011. Does antiretroviral therapy improve HIV-associated cognitive impairment? A quantitative review of the literature. *Int J Neuropsychol Soc*, 17(6), 956–969.
- Alter SP, Lenzi GM, Bernstein AI, Miller GW. 2013. Vesicular integrity in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 13(7), 362.
- Anderson E, Zink W, Xiong H, Gendelman HE. 1999. HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 31(Suppl 2), 43–54.
- Antinori A, Arendt G, Becker JT, Brew BJ, Byrd DA, Cherner M, et al. 2007. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology*, 69(18), 1789–1799.
- Apicella P. 2007. Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition. *Trends Neurosci*, 30(6), 299–306.
- Aquaro S, Ronga L, Pollicita M, Antinori A, Ranazzi A, Perno CF. 2005. Human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome dementia complex: role of cells of monocyte-macrophage lineage. *J Neurovir*, 11(Suppl3), 58–66.
- Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, Marx PA, et al. 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science*, 300(5626), 1713.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, et al. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes. *Pharmacol Rev*, 50(2), 291–313.
- Barnum CJ, Tansey, Malu G. 2010. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Brain Res*, 184, 113–132.
- Beal MF. 1992. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *J FASEB*, 6, 3338–3344.
- Bennett BD, Bolam JP. 1993. Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *BRES*, 609(1-2), 137–148.
- Bennett BD and Wilson CJ. 1999. Spontaneous Activity of Neostriatal Cholinergic Interneurons In Vitro. *J Neurosci*, 19, 5586–5598.
- Berger JR, Arendt G. 2000. HIV dementia: the role of the basal ganglia and dopaminergic systems. *J Psychopharm*, 14(3), 214–221.
- Bernstein AI, Stout KA, Miller GW. 2014. The vesicular monoamine transporter 2: an underexplored pharmacological target. *Neurochem Int*, 73, 89–97.
- Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, et al. 1997. Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci*, 17(17), 6761–6768.

- Boenisch TMS. 2011. IHC Handbook Table of Contents, 3rd edition. DAKO Corporation. Carpinteria California: Dako Corporation
- Bohnen NI, Albin RL, Koeppe RA, Wernette KA, Kilbourn MR, Minoshima S, et al. 2006. Positron emission tomography of monoaminergic vesicular binding in aging and Parkinson disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(9), 1198–1212.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PAC, Bevan MD. 2000. Review. *J Anat*, 196 (4), 527–542.
- Bonelli RM, Cummings JL. 2008. Frontal-subcortical dementias. *Neurology*, 14(2), 100–107.
- Bossuet C, Vaufrey F, Conde F, Chretien F, Pichon J, Hantraye P, et al. 2004. Up-regulation of glutamate concentration in the putamen and in the prefrontal cortex of asymptomatic SIVmac251-infected macaques without major brain involvement. *J Neurochem*, 88(4), 928–938.
- Boulland J, Qureshi T, Seal RP, Rafiki A, Gundersen V, Bergersen LH, et al. 2004. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol*, 480(3), 264–280.
- Bouwman FH, Skolasky RL, Hes D, Selnes OA, Glass JD, Nance-Sproson TE, et al. 1998. Variable progression of HIV-associated dementia. *Neurology*, 50(6), 1814–1820.
- Bradley PB and Brimblecombe RW. 1972. Biochemical and pharmacological mechanisms underlying behaviour. Elsevier Progr Brain Res.
- Brew BJ. 2004. Evidence for a change in AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy and the possibility of new forms of AIDS dementia complex. *AIDS*, 18(Suppl1), 75–78.
- Brew BJ, Rosenblum M, Cronin K, Price RW. 1995. AIDS dementia complex and HIV-1 brain infection: clinical-virological correlations. *Ann Neurol*, 38(4), 563–570.
- Broder CC and Collman RG. 1997. Chemokine receptors and HIV. *J Leukoc Biology*, 62, 20–29.
- Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. 2001. Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(3), 762–767.
- Burke WJ, Li SW, Chung HD, Ruggiero DA, Kristal BS, Johnson EM, et al. 2004. Neurotoxicity of MAO metabolites of catecholamine neurotransmitters: role in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicity*, 25(1-2), 101–115.
- Burnett JC, Rossi JJ. 2009. Stem cells, ribozymes and HIV. *Gene Ther*, 16(10), 1178–1179.
- Burnett JC, Rossi JJ. 2012. RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. *Chem Biol*, 19(1), 60–71.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. 2000. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci*, 23(3), 120–126.
- Campbell JH, Burdo TH, Autissier P, Bombardier JP, Westmoreland SV, Soulas C, et al. 2011. Minocycline inhibition of monocyte activation correlates with neuronal protection in SIV neuroAIDS. *Plos One*, 6(4), e18688.
- Chang L, Wang GJ, Volkow ND, Ernst T, Telang F, Logan J, et al. 2008. Decreased brain dopamine transporters are related to cognitive deficits in HIV patients with or without cocaine abuse. *Neuroimmunology*, 42(2), 869–878.
- Changeux JP. 2010. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci*, 11(6), 389–401.

- Chaudry FA, Reimer RJ, Belocchio EE, Danbolt NC, Osen K, Edwards RH, et al. 1998. The vesicular GABA transporter VGAT localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*, 18(23), 9733–9750.
- Clements JE, Mankowski JL, Gama L, Zink MC. 2008. The accelerated simian immunodeficiency virus macaque model of human immunodeficiency virus–associated neurological disease: From mechanism to treatment. *J Neurovirol*, 14(4), 309–317.
- Contant C, Umbriaco D, Garcia S, Watkins KC, Descarries L. 1996. Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience*, 71(4), 937–947.
- Cossette M, Lecomte F, Parent A. 2005. Morphology and distribution of dopaminergic neurons intrinsic to the human striatum. *J Chemical Neuroanat*, 29(1), 1–11.
- Cotman CW, Foster A, Lanthorn T. 1981. An overview of glutamate as a neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 27, 1–27.
- Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW. 1990. Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol*, 302(2), 197–205.
- Crittenden JR, Graybiel AM. 2011. Basal ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Front Neuroanat*, 5(59).
- Cusini A, Vernazza PL, Yerly S, Decosterd LA, Ledergerber B, Fux CA, et al. 2013. Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 62 (1), 28–35.
- Czub S, Koutsilieri E, Sopper S, Czub M, Stahl-Hennig C, Muller JG, et al. 2001. Enhancement of central nervous system pathology in early simian immunodeficiency virus infection by dopaminergic drugs. *Acta Neuropathol*, 101(2), 85–91.
- Da Cunha, Rausch M, Eiden L. 1995. An early increase in somatostatin mRNA expression in the frontal cortex of rhesus monkeys infected with simian immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 1371–1375.
- Danbolt NC. 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiology*, 65(1), 1–105.
- Daniel M, Letvin N, King N, Kannagi M, Sehgal P, Hunt R, et al. 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*, 228(4704), 1201–1204.
- Daniels RW, Collins CA, Chen K, Gelfand MV, Featherstone DE, DiAntonio A. 2006. A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron*, 49(1), 11–16.
- Dassie JP, Giangrande PH. 2013. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics. *Ther Deliv*, 4(12), 1527–1546.
- D'Aversa TG, Eugenini EA, Berman JW. 2005. NeuroAIDS: contributions of the human immunodeficiency virus-1 proteins Tat and gp120 as well as CD40 to microglial activation. *J Neurosci Res*, 81(3), 436–446.
- Defeudis F. 1977. GABA-receptors in the vertebrate nervous system. *Prog Neurobiol*, 9(3), 123–145.
- Depboylu C, Weihe E. 2004. Brain virus burden and indoleamine-2,3-dioxygenase expression during lentiviral infection of rhesus monkey are concomitantly lowered by 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *Eur J Neurosci*, 19, 2997–3005.
- Depboylu C, Schäfer M, Schwaeble W, Reinhart T, Maeda H, Mitsuya H, et al. 2005. Increase of C1q biosynthesis in brain microglia and macrophages during lentivirus infection in the rhesus macaque is sensitive to antiretroviral treatment with 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *Neurobiol of Dis*, 20(1), 12–26.

- Depboylu C, Eiden LE, Schäfer MKH, Reinhart TA, Mitsuya H, Schall TJ, et al. 2006. Fractalkine expression in the rhesus monkey brain during lentivirus infection and its control by 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *J Neuropath Exp Neurol*, 65(12), 1170–1180.
- Depboylu C, Eiden LE, Weihe E. 2007. Increased APOBEC3G expression is associated with extensive G-to-A hypermutation in viral DNA in rhesus macaque brain during lentiviral infection. *J Neuropath Exp Neurol*, 66(10), 901–912.
- Depboylu C, Weihe E, Eiden LE. 2011. COX1 and COX2 expression in non-neuronal cellular compartments of the rhesus macaque brain during lentiviral infection. *Neurobiol of Dis*, 42(1), 108–115.
- Depboylu C, Weihe E, Eiden LE. 2012. Lentiviral infection of rhesus macaques causes long-term injury to cortical and hippocampal projections of prostaglandin-expressing cholinergic basal forebrain neurons. *J Neuropath Exp Neurol*, 71(1), 15–27.
- Depboylu C. 2014. Non-serine-phosphorylated tyrosine hydroxylase expressing neurons are present in mouse striatum, accumbens and cortex that increase in number following dopaminergic denervation. *J Chem Neuroanat*, 56, 35–44.
- Depboylu C, Klietz M, Maurer L, Oertel WH, Kobayashi K, Weihe E, et al. 2014. Transcriptional and structural plasticity of tyrosine hydroxylase expressing neurons in both striatum and nucleus accumbens following dopaminergic denervation. *J Chem Neuroanat*, 61–62, 169–175.
- Desrosiers RC. 1990. The simian immunodeficiency viruses. *Ann Rev*, 8, 557–578.
- Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, et al. 2006. RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci*, 9(6), 832–842.
- Dingledine R, Hassel B. 2006. *Glutamate in Basic Neurochemistry* (Price R. D., ed.) NY: Elsevier.
- Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, Green SM, Heaphy S, Karn J, et al. 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(18), 6925–6929.
- Do J, Kim J, Bakes J, Lee K, Kaang BK. 2012. Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. *Learn Mem (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 20(1), 21–28.
- Doble A. 1999. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, 81(3), 163–221.
- Drew GM, Mitchell VA, Vaughan CW. 2008. Glutamate spillover modulates GABAergic synaptic transmission in the rat midbrain periaqueductal grey via metabotropic glutamate receptors and endocannabinoid signaling. *J Neurosci*, 28(4), 808–815.
- Dubach M, Schmidt R, Kunkel D, Bowden DM, Martin R, German DC. 1987. Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: Immunohistochemical evidence. *Neurosci Lett*, 75(2), 205–210.
- Edwards RH. 1992. The transport of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Curr Opin Neurobiol*, 2(5), 586–594.
- Eggers C. 2014. HIV-1-assoziierte neurokognitive Störung. *Aktuelle Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Nervenarzt*, 85(10), 1280–1290.
- Eiden LE, Rausch DM, Da Cunha A, Murray EA, Heyes M, Sharer L, et al. 1993. AIDS and the central nervous system: examining pathobiology and testing therapeutic strategies in the SIV-infected rhesus monkey. *Ann Acad Sci, NY*, 693(1), 229–244.

- Eiden LE. 2000. The vesicular neurotransmitter transporters: current perspectives and future prospects. *FASEB J*, 14, 2396–2400.
- Eiden LE, Schäfer MKH, Weihe E, Schütz B. 2004. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Eur J Physiol*, 447(5), 636–640.
- Eiden LE, Weihe E. 2011. VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. *Ann Acad Sci, NY*, 1216(1), 86–98.
- Elbirt D, Mahlab-Guri K, Bezalel-Rosenberg S, Gill H, Attali M, Asher I. 2015. HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). *J Isr Med Assoc*, 17(1), 54–59.
- Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F. 1990. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*, 345(6270), 84–86.
- Erickson JD, Schäfer MKH, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E. 1996. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Neurobiology*, 93, 5166–5171.
- Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE. 2008. Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traff CD*, 9(9), 1425–1436.
- Ferris MJ, Mactutus CF, Booze RM. 2008. Neurotoxic profiles of HIV, psychostimulant drugs of abuse, and their concerted effect on the brain: current status of dopamine system vulnerability in NeuroAIDS. *Neurosci Biobehav Rev*, 32(5), 883–909.
- Fonnum F. 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, 42(1), 1–11.
- Fonnum F, Malthe-Sørensen D. 1972. Molecular Properties of Choline Acetyltransferase and Their Importance for the Compartmentation of Acetylcholine Synthesis. Bradley PB and Brimblecombe RW (Hg.): *Prog Brain Res*, 36, 13–27.
- Freed EO. 1998. HIV-1 Gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, 251, 1–15.
- Freed E, Dawn JM, Risser R. 1990. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glykoprotein gp41. *Med Sci*, 87, 4650–4654.
- Frey KA, Koeppe RA, Kilbourn MR, Vander BTM, Albin RL, Gilman S, et al. 1996. Presynaptic monoaminergic vesicles in Parkinson's disease and normal aging. *Ann Neurol*, 40(6), 873–884.
- Fujiyama F, Kuramoto E, Okamoto K, Hioki H, Furuta T, Zhou L, et al. 2004. Presynaptic localization of an AMPA-type glutamate receptor in corticostriatal and thalamostriatal axon terminals. *Eur J Neurosci*, 20(12), 3322–3330.
- Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, Jones SR, Levey AI, Miller GW, et al. 1998. Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. *J Neurochem*, 70(5), 1973–1978.
- Gainetdinov RR, Caron MG. 2003. Monoamine transporters: from genes to behavior. *Ann Rev Pharmacol Toxicology*, 43, 261–284.
- Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. 2008. The structural biology of HIV assembly. *Curr Struct Biol*, 18(2), 203–217.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436–441.

- Gasnier B. 2004. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflugers Arch*, 447(5), 756–759.
- Gaskill PJ, Calderon TM, Luers AJ, Eugenin EA, Javitch JA, Berman JW. 2009. Human immunodeficiency virus (HIV) infection of human macrophages is increased by dopamine: a bridge between HIV-associated neurologic disorders and drug abuse. *Am J Pathol*, 175(3), 1148–1159.
- Gaskill PJ, Carvallo L, Eugenin EA, Berman JW. 2012. Characterization and function of the human macrophage dopaminergic system: implications for CNS disease and drug abuse. *J Neuroinflamm*, 9, 203.
- Gelman BB, Spencer JA, Holzer CE, Soukup VM. 2006. Abnormal striatal dopaminergic synapses in National NeuroAIDS Tissue Consortium subjects with HIV encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(4), 410–420.
- Gerfen CR. 1996. Integrated systems of the CNS, part III - Cerebellum, basal ganglia, olfactory system. Elsevier, (Handbook of Chem Neuroanat).
- Gerfen CR, Wilson CJ. 1996. Chapter II The basal ganglia. In: Charles R. Gerfen (Hg.): Integrated systems of the CNS, part III - Cerebellum, basal ganglia, olfactory system, Bd. 12, 371–468.
- Gilmor ML, Nash NR, Roghani AE, Yi H, Hersch SM, Levey AI. 1996. Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci*, 16(7), 2179–2190.
- Goldstein DS, Sullivan P, Holmes C, Kopin IJ, Basile MJ, Mash DC. 2011. Catechols in post-mortem brain of patients with Parkinson disease. *Eur J Neurol*, 18(5), 703–710.
- González-Scarano F, Martín-García J. 2005. The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*, 5(1), 69–81.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*, 305(24), 1425–1431.
- Grant I, Franklin DR Jr, Deutsch R, Woods SP, Vaida F, Ellis RJ, et al. 2014. Asymptomatic HIV-associated neurocognitive impairment increases risk for symptomatic decline. *Neurology*, 82(23), 2055–2062.
- Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, et al. 2008. The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci*, 11(3), 292–300.
- Graybiel AM. 1990. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci*, 13(7), 244–254.
- Greenamyre JT. 2001. Glutamateric Influence on The Basal Ganglia. Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia. *Clinic Neuropharmacol*, 24, 65–70.
- Groenewegen HJ, Trimble M. 2007. The ventral striatum as an interface between the limbic and the motor systems. *CNS Spectr*, 12, 887–892.
- Grund B, Wright EJ, Brew BJ, Price RW, Roediger MP, Bain MP, et al. 2013. Improved neurocognitive test performance in both arms of the SMART study: impact of practice effect. *J Neurovirol*, 19(4), 383–392.
- Guillot TS, Richardson JR, Wang MZ, Li YJ, Taylor TN, Ciliax BJ, et al. 2008. PACAP38 increases vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression and attenuates methamphetamine toxicity. *Neuropeptides*, 42(4), 423–434.
- Guillot TS, Miller GW. 2009. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Mol Neurobiol*, 39(2), 149–170.

- Guzman MS, Jaeger X, Raulic S, Souza IA, Li AX, Schmid S, et al. 2011. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission. *Plos Biol*, 9(11), 1001194.
- Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59(5), 1609–1623.
- Hanson GR, Sandoval V, Riddle E, Fleckenstein AE. 2004. Psychostimulants and vesicle trafficking: a novel mechanism and therapeutic implications. *Ann Acad Sci, NY*, 1025, 146–150.
- Hawkins MH, Mitsuya C, McCully K, Goldwin K, Murakami D, Poplack FB. 1995. pharmacokinetics of dideoxypurine nucleoside analogs in plasma and cerebrospinal fluid in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother*, 36(6) 1259-1264.
- Heaton RK, Clifford DB, Franklin DR, Woods SP, Ake C, Vaida F, et al. 2010. HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study, *Neurology*, 75(23), 2087–2096.
- Heaton RK, Franklin DR, Ellis RJ, McCutchan JA, Letendre SL, Leblanc S, et al. 2011. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol*, 17(1), 3–16.
- Hisano S. 2003. Vesicular glutamate transporters in the brain. *Anat Sci Int*, 78(4), 191–204.
- Hsu M, Wainberg MA. 2000. Interactions between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, tRNA primer, and nucleocapsid protein during reverse transcription. *J Hum Virol*, 3(1), 16–26.
- Hudson L, Liu J, Nath A, Jones M, Raghavan R, Narayan O, et al. 2000. Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J Neurovirol*, 6(2), 145–155.
- Huot P, Parent A. 2007. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *J Neurochem*, 101(6), 1441–1447.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res*, 57(1), 1–9.
- Itoh K, Mehraein P, Weis S. 2000. Neuronal damage of the substantia nigra in HIV-1 infected brains. *Acta Neuropathol*, 99(4), 376–384.
- Joel D, Weiner I. 2000. The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience*, 96(3), 451–474.
- Juge N, Muroyama A, Hiasa M, Omote H, Moriyama Y. 2009. Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl<sup>-</sup>/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem*, 284(50), 35073–35078.
- Juge N, Omote H, Moriyama Y. 2013. Vesicular GABA transporter (VGAT) transports  $\beta$ -alanine. *J Neurochem*, 127(4), 482–486.
- Kanki PJ, Hopper JR, Essex M. 1987. The Origins of HIV-1 and HTLV-4/HIV-2. *Ann Acad Sci, NY*, 511 (1 Normal and Ne), 370–375.
- Kaul M, Garden GA, Lipton SA. 2001. Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, 410(6831), 988–994.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18(12), 527–535.



- Keber U, Kietz M, Carlsson T, Oertel WH, Weihe E, Schafer MKH, et al. 2015. Striatal tyrosine hydroxylase-positive neurons are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Neuroscience*, 298, 302–317.
- Kerr DIB, Ong J. 1995. GABAB receptors. *Pharmacol Therapeut*, 67(2), 187–246.
- Kilbourn MR, Butch ER, Desmond T, Sherman P, Harris PE, Frey KA. 2010. In vivo <sup>11</sup>Cdihydrotetrabenazine binding in rat striatum: sensitivity to dopamine concentrations. *Nucl Med Biol*, 37(1), 3–8.
- Koutsilieri E, Czub S, Scheller C, Sopper S, Tatschner T, Stahl-Hennig C, et al. 2000. Brain choline acetyltransferase reduction in SIV infection. An index of early dementia? *Neuroreport*, 2(3), 2391–2393.
- Koutsilieri E, Sopper S, Scheller C, ter Meulen V, Riederer P. 2002. Involvement of dopamine in the progression of AIDS Dementia Complex. *J Neural Transm*, 109(3), 399–410.
- Koutsilieri E, Sopper S, Scheller C, ter Meulen V, Riederer P. 2002. Parkinsonism in HIV dementia. *J Neural Transm*, 109(5-6), 767–775.
- Kramer-Hammerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R. 2005. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res*, 111(2), 194–213.
- Kreitzer AC. 2009. Physiology and Pharmacology of Striatal Neurons. *Ann Rev Neurosci*, 32(1), 127–147.
- Kreitzer AC, Malenka RC. 2008. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Cell Press*, 60(4), 543–554.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19(8), 312–318.
- Kumar AM, Fernandez JB, Singer EJ, Commins D, Waldrop-Valverde D, Ownby RL, et al. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 in the central nervous system leads to decreased dopamine in different regions of postmortem human brains. *J Neurovirol*, 15(3), 257–274.
- Kumar AM, Ownby RL, Waldrop-Valverde D, Fernandez B, Kumar M. 2011. Human immunodeficiency virus infection in the CNS and decreased dopamine availability: relationship with neuropsychological performance. *J Neurovirol*, 17(1), 26–40.
- Lau A, Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv, Eur J Physiol*, 460(2), 525–542.
- Letendre S. 2011. Central nervous system complications in HIV disease: HIV-associated neurocognitive disorder. *Top Antivir Med*, 19(4), 137–142.
- Letendre SL, McCutchan JA, Childers ME, Woods SP, Lazzaretto D, Heaton RK, et al. 2004. Enhancing antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus cognitive disorders. *Ann Neurol*, 56(3), 416–423.
- Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, Collier AC, et al. 2008. Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol*, 65(1), 65–70.
- Letvin NL, King NW. 1990. Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 3(11), 1023–1040.
- Lau KA, Wong JLL. 2013. Current trends of HIV recombination worldwide. *Infect Dis Rep*, 5 (1S).

- Levy JA. 1996. The value of primate models for studying human immunodeficiency virus pathogenesis. *JM Primatol*, 25(3), 163–174.
- Lima RF, Prado VF, Prado MAM, Kushmerick C. 2010. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem*, 113(4), 943–951.
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW, et al. 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27(11), 2846–2857.
- Lynch DR, Guttman RP. 2002. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(3), 717–723.
- Marmor S, Donnell B, Celum B, Koblin S. 2001. Homozygous and heterozygous CCR5 DELTA 32.9. The HIV Network for Prevention Trials Vaccine Preparedness Protocol Team. *J AIDS*, 2, 472–481.
- Martens H, Weston MC, Boulland JL, Grønborg M, Grosche J, Kacza J, et al. 2008. Unique luminal localization of VGAT-C terminus allows for selective labeling of active cortical GABAergic synapses. *J Neurosci*, 28(49), 13125–13131.
- Marra CM, Zhao Y, Clifford DB, Letendre S, Evans S, Henry K, et al. 2009. Impact of combination antiretroviral therapy on cerebrospinal fluid HIV RNA and neurocognitive performance. *AIDS*, 23(11), 1359–1366.
- Marx PA, Apetrei C, Drucker E. 2004. AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol*, 33(5-6), 220–226.
- Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, et al. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med*, 305(24), 1431–1438.
- Maycox PR, Deckwerth T, Jahn R. 1990. Bacteriorhodopsin drives the glutamate transporter of synaptic vesicles after co-reconstitution. *J Embo*, 9(5), 1465–1469.
- Mazloom M, Smith Y. 2006. Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *J Comp Neurol*, 495(4), 453–469.
- Meredith GE, Farrell T, Kellaghan P, Tan Y, Zahm DS, Totterdell S. 1999. Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine depleting lesions. *Eur J Neurosci*, 11, 3585–3589.
- Mesulam MM, Mash D, Hersch L, Bothwell M, Geula C. 1992. Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus. *J Comp Neurol*, 323(2), 252–268.
- Meulendyke KA, Pletnikov MV, Engle EL, Tarwater PM, Graham DR, Zink MC. 2012. Early Minocycline Treatment Prevents a Decrease in Striatal Dopamine in an SIV Model of HIV-Associated Neurological Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7(2), 454–464.
- Mesulam MM, Mufson EL, Levey AL, Wainer BH. 1984. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase. *Neuroscience*, 12(3), 669–686.
- Midde NM, Gomez AM, Zhu J. 2012. HIV-1 Tat Protein Decreases Dopamine Transporter Cell Surface Expression and Vesicular Monoamine Transporter-2 Function in Rat Striatal Synaptosomes. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7(3), 629–639.

- Modrow S, Kattenbeck B, von Poblitzki A, Niedrig M, Wagner R, Wolf H. 1994. The gag proteins of human immunodeficiency virus type 1: mechanisms of virus assembly and possibilities for interference. *Med Microbiol Immunol*, 183(4), 177–194.
- Murray E, Rausch D, Lendway J, Eiden LE. 1992. Cognitive and Motor Impairments Associated with SIV Infection in Rhesus Monkeys. *Science*, 255, 1246–1249.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M. 2002. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res*, 43(2), 111–117.
- Nickell JR, Siripurapu KB, Vartak A, Crooks PA, Dwoskin LP. 2014. The vesicular monoamine transporter-2: an important pharmacological target for the discovery of novel therapeutics to treat methamphetamine abuse. *Adv Pharmacol Calif*, 69, 71–106.
- Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH, Pickel VM. 1997. Vesicular monoamine transporter-2: immunogold localization in striatal axons and terminals. *Synapse (N.Y.)* 26(2), 194–198.
- Nosheny RL, Bachis A, Aden SA, De Bernardi MA, Mocchetti I. 2006. Intrastratial administration of human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 reduces glial cell-line derived neurotrophic factor levels and causes apoptosis in the substantia nigra. *J Neurobiol*, 66(12), 1311–1321.
- O'Shea RD. 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clinic Exp Pharmacol Physiol*, (29), 1018–1023.
- Oda Y. 1999. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int*, 49(11), 921–937.
- Olney JW. 1990. Excitotoxicity: an overview. *Can Dis Wkly Rep*, 16(Suppl1E), 47-57.
- Palmer E, Goldsmith CS. 1988. Ultrastructure of human retroviruses. *J Electron Microsc Techn*, 8(1), 3–15.
- Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Rev*, 20(1), 91–127.
- Parsons SM. 2000. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *J FASEB*, 14(15), 2423–2434.
- Patel K, Ming X, Williams PL, Robertson KR, Oleske JM, Seage GR 3rd. 2009. Impact of HAART and CNS-penetrating antiretroviral regimens on HIV encephalopathy among perinatally infected children and adolescents. *AIDS*, 23(14), 1893–1901.
- Peter D, Jimenez J, Liu Y, Kim J, Edwards RH. 1994. The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem*, 269(10), 7231–7237.
- Pifl C, Rajput A, Reither H, Blesa J, Cavada C, Obeso JA, et al. 2014. Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum. *J Neurosci*, 34(24), 8210–8218.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G. 2000. Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic Interneurons. *J Neurosci*, 20(7), RC69.
- Potter MC, Figueroa-Losada M, Rojas C, Slusher BS. 2013. Targeting the glutamatergic system for the treatment of HIV-associated neurocognitive disorders. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(3), 594–607.
- Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, et al. 2006. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*, 51(5), 601–612.

- Purohit V, Rapaka R, Shurtleff D. 2011. Drugs of abuse, dopamine, and HIV-associated neurocognitive disorders/HIV-associated dementia. *Molec Neurobiol*, 44(1), 102–110.
- Ratai EM, Bombardier JP, Joo CG, Annamalai L, Burdo TH, Campbell J, et al. 2010. Proton magnetic resonance spectroscopy reveals neuroprotection by oral minocycline in a nonhuman primate model of accelerated NeuroAIDS. *Plos One*, 5(5), 10523.
- Rausch DE, Weihe E, Eiden LE. 1994. Cytopathologic and neurochemical correlates of progression to motor/cognitive impairment in SIV-infected rhesus monkeys. *J Neuropath Exp Neurol*, 53, 165–175.
- Rausch DE, Eiden LE. 1999. The SIV-infected rhesus monkey model for HIV-associated dementia and implications for neurological diseases. *J Leukoc Biol*, 65, 466–474.
- Rees JN, Florang VR, Eckert LL, Doorn JA. 2009. Protein reactivity of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, a toxic dopamine metabolite, is dependent on both the aldehyde and the catechol. *Chem Res Toxicology*, 22(7), 1256–1263.
- Reimer RJ, Edwards RH. 2004. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch*, 447(5), 629–635.
- Ren J, Qin C, Hu F, Tan J, Qiu L, Zhao S, et al. 2011. Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*, 69(3), 445–452.
- Reyes MG, Faraldi F, Senseng CS, Flowers C, Fariello R. 1991. Nigral degeneration in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropath*, 82(1), 39–44.
- Robert Koch-Institut (RKI): *Epidem Bull*, 45/2013.
- Rothman SM, Olney JW. 1995. Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years. *Trends Neurosci*, 18(2), 57–58.
- Rugelese MT, Solano F, Díaz FJ, Bedoya VI, Patiño PJ. 2002. Molecular characterization of the CCR 5 gene in seronegative individuals exposed to human immunodeficiency virus (HIV). *J Clin Virol*, 23(3), 161–169.
- Sacktor N, Lyles RH, Skolasky R, Kleeberger C, Selnes OA, Miller EN, et al. 2001. HIV-associated neurologic disease incidence changes:: Multicenter AIDS Cohort Study, 1990-1998. *Neurology*, 56(2), 257–260.
- Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y, et al. 2010. The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. *Mol Brain*, 3(40).
- Sakurada T, Alufuzoff I, Winblad B, Nordberg A. 1990. Substance P-like immunoreactivity, choline acetyltransferase activity and cholinergic muscarinic receptors in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Brain Res*, 521(1-2), 329–332.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Ruckert B, Liesnard C, Farber CM, et al. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 382, 722–725.
- Sandoval V, Riddle EL, Hanson GR, Fleckenstein AE. 2002. Methylphenidate redistributes vesicular monoamine transporter-2: role of dopamine receptors. *J Neurosci*, 22(19), 8705–8710.
- Sanmarti M, Ibáñez L, Huertas S, Badenes D, Dalmau D, Slevin M, et al. 2014. HIV-associated neurocognitive disorders. *J Mol Psychiatry*, 2(1), 2.
- Sardar AM, Czudek C, Reynolds GP. 1996. Dopamine deficits in the brain: the neurochemical basis of parkinsonian symptoms in AIDS. *Neuroreport*, 7(4), 910–912.

- Sattentau QJ, Clapham PR, Weiss RA, Beverley PC, Montagnier L, Alhalabi MF, et al. 1998. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *AIDS*, 2, 101–105.
- Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard K, Zhang ZQ, Krieger J, et al. 2001. Productive Infection of T Cells in Lymphoid Tissues during Primary and Early Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Dis*, 183, 555–562.
- Schäfer MK, Weihe E, Varoqui H, Eiden LE, Erickson JD. 1994. Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J Mol Neurosci*, 5(1), 1–26.
- Schäfer MKH, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. 2002. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem*, 277(52), 50734–50748.
- Schäfer MK, Eiden LE, Weihe E. 1998. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience*, 84(2), 331–359.
- Schäfer MKH, Weihe E, Eiden LE. 2013. Localization and expression of VMAT2 across mammalian species: a translational guide for its visualization and targeting in health and disease. *Adv Pharmacol (San Diego, Calif.)*, 68, 319–334.
- Scheller C, Arendt G, Nolting T, Antke C, Sopper S, Maschke M, et al. 2010. Increased dopaminergic neurotransmission in therapy-naïve asymptomatic HIV patients is not associated with adaptive changes at the dopaminergic synapses. *J Neural Transm*, 117(6), 699–705.
- Scheller C, Sopper S, Jenuwein M, Neuen-Jacob E, Tatschner T, Grünblatt E, et al. 2005. Early impairment in dopaminergic neurotransmission in brains of SIV-infected rhesus monkeys due to microglia activation. *J Neurochem*, 95(2), 377–387.
- Scholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87, 387–406.
- Schuldiner S, Shirvan A, Linial M. 1995. Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol Rev*, 75(2), 369–392.
- Sem'yanov AV. 2005. Diffusional extrasynaptic neurotransmission via glutamate and GABA. *Neurosci. Behav Physiol*, 35(3), 253–266.
- Sharp PM, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hahn BH. 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Biol Sci, Lond*, 356(1410), 867–876.
- Shapshak P, Kanguane P, Fujimura RK, Commins D, Chiappelli F, Singer E, et al. 2011. Editorial neuroAIDS review. *AIDS (London, England)*, 25(2), 123–141.
- Sharp PM, Bailes E, Gao F, Beer BE, Hirsch VM and Hahn BH. 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Evolution of Sequences, Structures and Genomes, Biochem Soc Trans* 28(2), 275–82.
- Sharp PM, Hahn BH. 2010. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Biol Sci*, 365(1552), 2487–2494.
- Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*, 34(4), 233–244.
- Simioni S, Cavassini M, Annoni JM, Rimbault A, Bourquin I, Schiffer V, et al. 2010. Cognitive dysfunction in HIV patients despite long-standing suppression of viremia. *AIDS*, 24(9), 1243–1250.

- Smith Y, Parent A. 1986. Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: Morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res*, 372(2), 241–252.
- Smith, Bevan, Shink, Bolam 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, 86(2), 353–387.
- Song H, Ming G, Fon E, Bellocchio E, Edwards RH, Poo M. 1997. Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron*, 18(5), 815–826.
- Sopper S, Koutsillieri E, Scheller C, Czub S, Riederer P, ter Meulen V. 2002. Macaque animal model for HIV-induced neurological disease. *J Neural Transm*, 109, 747–766.
- Stellbrink HJ Leitlinienkoordination. 2012. Deutsch \Österreichische Therapieleitlinien HIV Version 4 rev nach AWMF) DAIG (Version 04.1)
- Stokes AH, Hastings TG, Vrana KE. 1999. Cytotoxic and Genotoxic Potential of Dopamine. Mini Review. *J Neurosci Res*, (55), 659–665.
- Sudhof TC, Jahn R. 1991. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, 6(5), 665–677.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. 2007. D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci*, 30(5), 228–235.
- Suzuki M, Desmond TJ, Albin RL, Frey KA. 2001. Vesicular neurotransmitter transporters in Huntington's disease: initial observations and comparison with traditional synaptic markers. *Synapse*, 41(4), 329–336.
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, et al. 1997. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(18), 9938–9943.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, et al. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831–846.
- Tan IL, McArthur JC. 2011. HIV-associated central nervous system diseases in the era of combination antiretroviral therapy. *Eur J Neurol*, 18(3), 371–372.
- Tandé D, Höglinger G, Debeir T, Freundlieb N, Hirsch EC, François C. 2006. New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain*, 129(5), 1194–1200.
- Tarazi FI, Baldessarini RJ. 1999. Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. Mini Review. *J Neurosci*, 55, 401–410.
- Tashiro Y, Sugimoto T, Hattori T, Uemura Y, Nagatsu I, Kikuchi H, Mizuno N. 1989. Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neurosci Lett*, 97(1-2), 6–10.
- Tepper JM, Bolam JP. 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiology*, 14(6), 685–692.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T, Ibanez-Sandoval O. 2010. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat*, 4, 150.
- Theodore S, Cass WA, Maragos WF. 2006a. Involvement of cytokines in human immunodeficiency virus-1 protein Tat and methamphetamine interactions in the striatum. *Exp Neurol*, 199(2), 490–498.

- Theodore S, Cass WA, Maragos WF. 2006b. Methamphetamine and human immunodeficiency virus protein Tat synergize to destroy dopaminergic terminals in the rat striatum. *Neuroscience*, 137(3), 925–935.
- Theodore S, Cass WA, Dwoskin LP, Maragos WF. 2012. HIV-1 protein Tat inhibits vesicular monoamine transporter-2 activity in rat striatum. *Synapse*, 66(8), 755–757.
- Ton H, Xiong H. 2013. Astrocyte dysfunctions and HIV-1 neurotoxicity. *J AIDS Clin Res*, 4 (11), 255.
- Trono D. 1995. HIV accessory proteins: Leading roles for the supporting cast. *Cell*, 82(2), 189–192.
- Truong JG, Hanson GR, Fleckenstein AE. 2004. Apomorphine increases vesicular monoamine transporter-2 function: implications for neurodegeneration. *Eur J Pharmacol*, 492(2-3), 143–147.
- Truong JG, Rau KS, Hanson GR, Fleckenstein AE. 2003. Pramipexole increases vesicular dopamine uptake: implications for treatment of Parkinson's neurodegeneration. *Eur J Pharmacol*, 474(2-3), 223–226.
- Ugrumov MV. 2013. Brain neurons partly expressing dopaminergic phenotype: location, development, functional significance, and regulation. *Adv Pharmacol*, 68, 37–91.
- UNAIDS: Global Report 2013.
- Unal B, Ibanez-Sandoval O, Shah F, Abercrombie ED, Tepper JM. 2011. Distribution of tyrosine hydroxylase-expressing interneurons with respect to anatomical organization of the neostriatum. *Front Syst Neurosci*, 5, 41.
- Varoqui H, Erickson JD. 1996. Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *J Biol Chem*, 271(44), 27229–27232.
- Wainberg MA, Jeang KT. 2008. 25 years of HIV-1 research - progress and perspectives. *BMC Med*, 6, 31.
- Wang GJa, Chang L, Volkow ND, Telang F, Logan J, Ernst T, et al. 2004. Decreased brain dopaminergic transporters in HIV-associated dementia patients. *Brain*, 127(11), 2452–2458.
- Wang P, Barks JD, Silverstein FS. 1999. Tat, a human immunodeficiency virus-1-derived protein, augments excitotoxic hippocampal injury in neonatal rats. *Neuroscience*, 88(2), 585–597.
- Warner CG, Peterlin BM. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. Review. *Nat Med*, 8, 673–680.
- Weihe E, Nohr D, Sharer L, Murray E, Rausch D, Eiden LE. 1993. Cortical astrocytosis in juvenile rhesus monkeys infected with simian immunodeficiency virus. *Neuroreport*, 4(3), 263–266.
- Weihe E, Tao-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE. 1996. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(8), 3547–3552.
- Weihe E, Depboylu C, Schütz B, Schäfer MKH, Eiden LE. 2006. Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell Mol Neurobiol*, 26(4-6), 659–678.
- Weiss RA. 1996. Retrovirus classification and cell interactions. *J Antimicrob Chemother*, (Suppl. B), 1–11

- Whitcomb JM, Hughes SH. 1992. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Ann Rev Cell Biol*, 8, 275–306.
- Williams KC, Hickey WF. 2002. Central nervous damage, monocytes and macrophages, and neurological disorders in AIDS. *Ann Rev Neuro*, 25(1), 537–562.
- Wilson CJ. 2005. The mechanism of intrinsic amplification of hyperpolarizations and spontaneous bursting in striatal cholinergic interneurons. *Neuron*, 45(4), 575–585.
- Wilson CJ, Chang HT and Kitai ST. 1990. Firing patterns and synaptic potentials of identified giant spiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci*, 10(2), 508–519.
- Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB. 2002. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem, Sci* 27(3), 139–147.
- Wu Y. 2004. HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*, 1(1), 13.
- Xing HQ, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo K, Kuboda R, et al. 2008. Impaired astrocytes and diffuse activation of microglia in the cerebral cortex in simian immunodeficiency virus-infected macaques without simian immunodeficiency virus encephalitis. *J Neuropath Exp Neurol*, 67(6), 600–611.
- Yan Z, Song WJ, Surmeier DJ. 1997. D2 Dopamine receptors reduce N-type Ca<sub>2</sub> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited Protein-Kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol*, 77(2), 1003–1015.
- Zahid M, Saeed M, Yang L, Beseler C, Rogan E, Cavalieri EL. 2011. Formation of dopamine quinone-DNA adducts and their potential role in the etiology of Parkinson's disease. *lubmb Life*, 63(12), 1087–1093.
- Zauli G, Secchiero P, Rodell L, Gibellini D, Mirandola P, Mazzoni M, et al. 2000. HIV-1 Tat-mediated inhibition of the tyrosine hydroxylase gene expression in dopaminergic neuronal cells. *J Biol Chem*, 275, 4951–4965.
- Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA. 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol*, 53(4), 590–605.
- Zhu J, Mactutus CF, Wallace DR, Booze RM. 2009. HIV-1 Tat protein-induced rapid and reversible decrease in [3H]dopamine uptake: dissociation of [3H]dopamine uptake and [3H]2beta-carbomethoxy-3-beta-(4-fluorophenyl)tropane (WIN 35,428) binding in rat striatal synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 329(3), 1071–1083.
- Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 391(6667), 594–597.
- Zink MC, Brice AK, Kelly KM, Queen SE, Gama L, Li M, et al. 2010. Simian immunodeficiency virus-infected macaques treated with highly active antiretroviral therapy have reduced central nervous system viral replication and inflammation but persistence of viral DNA. *J Infect Dis*, 202(1), 161–170.
- Zink MC, Spelman JP, Clemens JE. 1998. SIV infection of macaques- modelling the progression to AIDS dementia. *J Neuro Virol*, 4, 249–259.
- Zink MC, Uhrlaub J, DeWitt J, Voelker T, Bullock B, Mankowski J, et al. 2005. Neuroprotective and anti-human immunodeficiency virus activity of minocycline. *JAMA*, 293(16), 2003–2011.
- Zubieta JK, Huguelet P, Ohl LE, Koeppe RA, Kilbourn MR, Carr JM, et al. 2000. High vesicular monoamine transporter binding in asymptomatic bipolar I disorder: sex differences and cognitive correlates. *Am J Psychiatry*, 157(10), 1619–1628.



Zubieta JK, Taylor SF, Huguelet P, Koeppe RA, Kilbourn MR, Frey KA. 2001. Vesicular monoamine transporter concentrations in bipolar disorder type I, schizophrenia, and healthy subjects. *Biol Psychiatry*, 49(2), 110–116.

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen/Herren Dres.

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Baumann, Becker A., Becker K., Becker S., Bein, Bette, Bien, Bösner, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Depboylu, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Fendrich, Fuchs-Winkelmann, Görg C., Gress, Grosse, Grzeschik, Grimm, Hamer, Hertl, Hildebrand, Hofer, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Kann, Kinscherf, Kirchner, Klose, Knake, Koolman, Kotschulla, Köhler, Krieg, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Max, Metzelder, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Plant, Renz, Richter, Ries, Rolfes, Rothmund, Röhm, Ruchholtz, Schäfer J., Schäfer M., Schneider, Schütz, Seitz, Sekundo, Steinfeldt, Tackenberg, Vassiliou, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Werner, Wiegand, Wilhelm, Wulf, Zemlin.

## 7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich bei Herrn Prof. Dr. E. Weihe, der es mir ermöglicht hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, bedanken. Besonders die intensive Betreuung, das stets offene Ohr und die vielen Diskussionen haben meine Forschungsarbeit bereichert. Seine fachliche Kompetenz und wissenschaftliche Kreativität haben mich stets inspiriert.

Bei Herrn PD Dr. med. C. Depboylu möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Seine stetige Bereitschaft, mit mir Fragen und Probleme zu besprechen und seine Unterstützung bei der Planung und Durchführung haben mir meine Dissertation ermöglicht. Ebenso möchte ich mich für die große Mühe, die er in die Korrektur meiner Dissertation investiert hat, bedanken.

Herrn Dr. L. E. Eiden (NIH, USA) möchte ich ganz herzlich für die regelmäßigen Sessions danken, die immer ein Vorankommen meiner Arbeit bedeutet haben.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der AG Weihe für die wundervollen Jahre der Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Marion Zibuschka für die Hilfsbereitschaft und Freundschaft. Auch gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. MK Schäfer, Herrn PD Dr. M. Bette, Herrn Prof. Dr. B. Schütz und Frau Dr. M. Bertoune für ihre wertvollen Impulse und Hilfestellungen.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich für das Stipendium des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg. Herrn Roman Pahl aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg gilt mein Dank für die Kontrolle der statistischen Analysen.